

Arthritisinduktion durch Immunität gegen ein systemisch exprimiertes Autoantigen – Untersuchung im Tiermodell und bei Patienten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom Biochemiker David Schubert
geb. 3.12.1974 in Berlin, Deutschland

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Harald Saumweber
 2. Prof. Dr. Thomas Kamradt
 3. Prof. Dr. Roland Lauster

Tag der mündlichen Prüfung: 1.6.2005

Inhaltsverzeichnis

Zielsetzung der Arbeit	1
1 Einleitung	2
1.1 Rheumatoide Arthritis	2
1.1.1 Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der RA.....	3
1.1.2 Die Rolle der MHC-Proteine und der T-Zellen in der Pathogenese der RA.....	3
1.1.3 Die Rolle der Zytokine in der Pathogenese der RA.....	4
1.1.4 Die Therapie der Rheumatoiden Arthritis	6
1.2 Tiermodelle der Rheumatoiden Arthritis	7
1.2.1 Das Kollagen-induzierte Tiermodell (CIA)	8
1.2.1.1 Die Rolle der MHC-Proteine und der T-Zellen in der CIA.....	8
1.2.1.2 Die Rolle der B-Zellen und Autoantikörper in der CIA	9
1.2.1.3 Die Rolle des Komplements und der Fc-Rezeptoren in der CIA	10
1.2.1.4 Die Rolle der Zytokine in der CIA.....	11
1.2.2 Das K/BxN-Modell.....	11
1.2.2.1 Die Rolle des MHC und des transgenen T-Zellrezeptors im K/BxN-Modell	12
1.2.2.2 Die Rolle der B-Zellen und anti-G6PI Antikörper im K/BxN-Modell	13
1.2.2.3 Die Rolle des Komplements und der Fc-Rezeptoren im K/BxN-Modell	14
1.2.2.4 Die Rolle von TNF- α , IL-1 und IL-6 im K/BxN-Modell.....	15
2 Material	16
2.1 Mäuse	16
2.2 Chemikalien und Enzyme	16
2.3 Antikörper	19
2.3.1 Antikörper für die Verwendung im ELISA und Immunoblot	19
2.3.2 Antikörper und Sekundärfarbstoffe für die Durchflusszytometrie	19
2.3.3 Antikörper für <i>in vivo</i> Studien.....	21
2.4 Primer und Vektoren	21
2.5 Patientenserum	22
2.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	22
2.6.1 Zellkulturmedien.....	22
2.6.2 Puffer und Lösungen	23
2.6.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
2.6.2.2 Agarosegelelektrophorese	23
2.6.2.3 Immunoblot	23
2.6.2.4 Puffer zur Aufreinigung von rekombinanter G6PI	24
2.6.2.5 Puffer bei der Aufreinigung von IgG aus murinem Serum	24

2.6.2.6	FACS.....	24
2.6.2.7	ELISA	25
2.6.2.8	Andere Puffer	25
2.7	Verbrauchsmaterialien.....	25
2.8	Geräte.....	26
3	Methoden	28
3.1	Methoden der Mikrobiologie.....	28
3.1.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	28
3.1.2	Expression der rekombinanten humanen und murinen G6PI	28
3.2	Methoden der Molekularbiologie	28
3.2.1	Klonierung der murinen G6PI-cDNA in pQE100S.....	28
3.2.2	Agarosegelelektrophorese.....	30
3.3	Methoden der Proteinbiochemie.....	30
3.3.1	Aufreinigung der G6PI	30
3.3.2	IgG-Aufreinigung.....	31
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.3.4	Immunoblot	32
3.3.5	Enzymaktivität der G6PI	32
3.3.6	MALDI-MS Analyse	33
3.4	Methoden der Zellbiologie.....	34
3.4.1	Zellkultur	34
3.4.2	Gewinnung von Zellen aus der Milz und den Lymphknoten.....	34
3.4.3	Gewinnung von Zellen aus dem Blut.....	34
3.4.4	Proliferationstest	35
3.4.5	Komplementaktivitätstest.....	35
3.4.6	ELISA.....	36
3.4.7	Durchflusszytometrie	38
3.4.7.1	Methode	38
3.4.7.2	Oberflächenfärbung	38
3.4.7.3	Intrazelluläre Färbung muriner Zellen.....	39
3.4.7.4	Intrazelluläre Färbung humaner Zellen.....	39
3.4.7.5	Färbung mit CFDA-SE	40
3.5	Tierversuche.....	40
3.5.1	Genotypisierung der Fc γ -Rezeptor defizienten Mäuse.....	40
3.5.2	Immunisierung	41
3.5.3	Serum- und Blutgewinnung	42
3.5.4	Intraperitoneale Injektionen	42
3.5.5	Histologie	43

4	Ergebnisse	44
4.1	Die Rolle der Glukose-6-phosphat Isomerase als Autoantigen bei Patienten mit RA	44
4.1.1	CD4 ⁺ Zellantwort bei Patienten mit rheumatoider Arthritis	44
4.1.2	Die humorale Immunantwort gegen humane und Kaninchen Glukose-6-phosphat Isomerase bei RA-Patienten.....	47
4.1.3	Immunoblot- und MALDI-Analyse eines potentiellen Autoantigens bei rheumatoider Arthritis.....	48
4.1.4	Die humorale Immunantwort gegen die M-Kette der Kreatinkinase bei RA-Patienten ...	51
4.2	Die Induktion und Beschreibung einer Arthritis mit Glukose-6-phosphat Isomerase in der Maus	53
4.2.1	Arthritisinduktion in der Maus durch Immunisierung mit humaner Glukose-6-phosphate Isomerase	53
4.2.2	Klinischer Verlauf nach Arthritisinduktion mit humaner Glukose-6-phosphat Isomerase	55
4.2.3	Histologischer Verlauf nach Arthritisinduktion mit humaner Glukose-6-phosphat Isomerase	56
4.2.4	Histologische Analyse nicht-suszeptibler Mausstämme nach Immunisierung mit Glukose-6-phosphat Isomerase	59
4.2.5	Histologische Analyse der inneren Organe und Wirbelsäule von DBA/1 Mäusen nach Arthritisinduktion	61
4.2.6	Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen mit rekombinanter muriner Glukose-6-phosphat Isomerase	62
4.2.7	Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen mit denaturierter humaner Glukose-6-phosphat Isomerase	63
4.2.8	Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen mit Kaninchen Glukose-6-phosphat Isomerase.....	64
4.2.9	Enzymaktivität der Glukose-6-phosphat Isomerase im Serum unterschiedlicher Mausstämme	65
4.3	Die Rolle der B-Zellen, der Antikörper und des Komplements in der G6PI-induzierten Arthritis.....	66
4.3.1	Die humorale Immunantwort gegen Glukose-6-phosphat Isomerase in DBA/1 Mäusen und nicht suszeptiblen Stämmen.....	66
4.3.2	Die unterschiedlichen Isotypen der anti-G6PI Antikörper nach Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen	69
4.3.3	Bildung von Rheumafaktoren, dsDNS-Antikörpern sowie anti-Kollagen Antikörpern nach Arthritisinduktion	70
4.3.4	Transfer der Arthritis durch Transfer von Antikörpern in DBA/1 Mäusen.....	72
4.3.5	Die Rolle der Fc γ -Rezeptoren bei der Arthritisinduktion mit Glukose-6-phosphat Isomerase	73
4.3.6	Die Rolle des Komplementfaktors C5 bei der Arthritisinduktion mit Glukose-6-phosphat Isomerase	77

4.4	Die Rolle der T-Zellen und Zytokine in der G6PI-induzierten Arthritis	79
4.4.1	Zelluläre Antwort auf Glukose-6-phosphat Isomerase nach Immunisierung.....	79
4.4.2	Messung der Proliferation der T-Lymphozyten mit CFDA-SE.....	80
4.4.3	Zytokinproduktion von CD4 ⁺ T-Zellen nach Restimulation mit Glukose-6-phosphat Isomerase	81
4.4.4	Prävention der G6PI-induzierten Arthritis durch TNF-Blockade.....	84
4.4.5	Therapie der G6PI-induzierten Arthritis durch TNF-Blockade.....	87
4.4.6	CD4 ⁺ Zelldepletion in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis.....	88
4.4.7	CD4 ⁺ Zelldepletion in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis.....	91
4.4.8	Die Rolle der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	93
5	Diskussion	98
5.1	Die Rolle von G6PI als Autoantigen in RA	98
5.1.1	Die Rolle der CD4 ⁺ T-Zellen	98
5.1.2	Die Rolle der B-Zellen und anti-G6PI Antikörper.....	100
5.2	Die Rolle der G6PI als Autoantigen in der Maus	102
5.2.1	Die Suszeptibilität für G6PI-induzierte Arthritis in unterschiedlichen Mausstämmen....	102
5.2.2	Der histologische Befund in den unterschiedlichen Mausstämmen und die Eignung als Modell für die rheumatoide Arthritis.....	104
5.2.3	Die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis mit endogener, denaturierter und heterologer G6PI.....	105
5.2.4	Die Rolle der Antikörper und des Komplementsystems in der G6PI-induzierten Arthritis	110
5.2.5	Die Rolle der T-Zellen und der von ihnen produzierten Zytokine in der G6PI-induzierten Arthritis.....	115
5.2.6	Die Rolle von CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis	121
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	122
	Zusammenfassung	124
	Abkürzungsverzeichnis	126
	Literaturverzeichnis	129
	Danksagung	152
	Eidesstattliche Erklärung	153
	Publikationen und Präsentationen	154

Zielsetzung der Arbeit

Ungefähr 1% der Bevölkerung der westlichen Welt leidet an rheumatoider Arthritis (RA). Trotz intensiver Forschung sind die Ätiologie und die pathologischen Mechanismen der RA bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die Suche nach pathogenen Antigenen war bis jetzt hauptsächlich auf gelenkspezifische Antigene fokussiert. In einem T-Zellrezeptor transgenen Mausmodell wird die ubiquitär exprimierte Glukose-6-phosphat Isomerase (G6PI) von auto-reaktiven T- und B-Zellen erkannt. Diese Mäuse entwickeln spontan eine antikörpervermittelte Arthritis, die viele Gemeinsamkeiten mit der humanen RA aufweist.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Relevanz der G6PI bei der Pathogenese der RA zu untersuchen. Dazu sollen G6PI spezifische $CD4^+$ T-Zellen im Blut von RA-Patienten über die Expression der Zytokine $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ nach Restimulation mit G6PI nachgewiesen werden. Gleichzeitig soll im ELISA untersucht werden, ob RA-Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen G6PI entwickeln.

Daneben soll untersucht werden, ob die Immunisierung mit G6PI in normalen nicht-transgenen Tieren eine Arthritis auslösen kann, die der humanen RA ähnelt. Dadurch soll zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Autoimmunreaktion gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen eine organspezifische Erkrankung in nicht-transgenen Mäusen induzieren kann.

Insbesondere soll untersucht werden, ob die arthritischen Mäuse Antikörper gegen G6PI entwickeln, und ob diese Antikörper pathogen sind und die Arthritis transferieren können. Die Beteiligung der Antikörper soll indirekt auch durch Verwendung $Fc\gamma$ -Rezeptor defizienter Stämme gezeigt werden.

Daneben soll untersucht werden, ob auch Mechanismen der angeborenen Immunität von Bedeutung sind und die Depletion des zentralen Proteins der Komplementkaskade C5 die Entwicklung der Arthritis beeinflusst.

Zusätzlich soll die $CD4^+$ T-Zellantwort in Form der Proliferation und der G6PI spezifischen Zytokinantwort der $CD4^+$ T-Zellen untersucht werden. Der Einfluss des von Makrophagen und T-Zellen produzierten $TNF-\alpha$ während der Induktion und im Verlauf der Arthritis soll durch Blockade mit einem löslichen TNF -Rezeptor ermittelt werden. Die Bedeutung der $CD4^+$ T-Zellen für die Entwicklung der Arthritis und der anti-G6PI Antikörper soll durch Depletion der $CD4^+$ T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Induktions- und Effektorphase gezeigt werden. Außerdem soll durch Depletion der regulatorischen $CD4^+CD25^+$ Zellen vor Immunisierung untersucht werden, ob die Entwicklung der Arthritis in den empfänglichen und nichtempfänglichen Stämmen durch diese Zellen kontrolliert wird.

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, entzündliche und systemische Erkrankung, die hauptsächlich die Gelenke betrifft. Ungefähr 1% der Bevölkerung der westlichen Welt leidet an dieser Autoimmunerkrankung. Eine fortgeschrittene RA führt oft zur Arbeitsunfähigkeit und zu einer stark eingeschränkten Lebensqualität (Gabriel (2001), Wolfe und Hawley (1998)). RA tritt bei Frauen dreimal häufiger auf und führt zu einer erhöhten Mortalität, wenn die RA nicht entsprechend behandelt wird (Pincus et al. (1994)). Die RA ist charakterisiert durch die Entwicklung einer progressiven und chronischen Polyarthritits in den synovialen Gelenken. Typisch für RA ist der symmetrische Befall der kleinen Gelenke. Betroffen sind vor allem die Metacarpophalangeal- (MCP), Hand-, proximalen Interphalangeal- (PIP), Metatarsophalangeal- (PTP), Knie-, Sprung- und Ellenbogengelenke, sowie die Schulter. Bei einem Drittel der Patienten ist auch die Halswirbelsäule betroffen. Neben der Synovitis im Gelenk können häufig auch extraartikuläre Manifestationen festgestellt werden. In einigen Patienten bilden sich subkutane Granulome, die sogenannten Rheumaknoten. Einige Patienten entwickeln auch eine Vaskulitis. Außerdem können die Augen, die Lunge, das Herz und die Nieren betroffen sein (Klippel und Dieppe (1998), Maddison et al. (2004)).



Abb. 1.1: Rheumatoide Veränderungen an der Hand. Die chronische Entzündung der metacarpophalangealen Gelenke führt zur Deformation der Hände mit einer Deviation der Finger. Copyright ©2002, The School of Medicine of the University of California, San Diego, Katalog für medizinische Bilder

Eine Sonderform der rheumatoiden Arthritis ist das Felty-Syndrom. Es tritt vorwiegend bei langjährigen, progressiven und schweren Verläufen bei weniger als 1% der RA-Patienten auf. Gekennzeichnet ist das Felty-Syndrom durch eine vergrößerte Milz und manchmal auch der

Lymphknoten, sowie eine starke Verminderung der Granulozyten. Bei schweren Verläufen eines Felty-Syndroms entwickeln sich außerdem große Geschwüre an den Unterschenkeln.

1.1.1 Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der RA

Den B-Zellen wird eine große Rolle bei der Pathogenese zugeschrieben. Eine Depletion von B-Zellen ist therapeutisch wirksam (Edwards et al. (2004)). Außerdem können bei vielen Patienten Rheumafaktoren detektiert werden. Rheumafaktoren (RF) sind vor allem IgM Antikörper, die den Fc-Teil von IgG Antikörpern erkennen. Sie sind nicht spezifisch für RA, da z.B. auch Patienten mit Sjögren Syndrom oder Patienten mit Infektionen wie Tuberkulose und Hepatitis RF entwickeln. Bis jetzt ist nicht klar, welche Rolle sie bei RA spielen, obwohl ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der RF und dem Schweregrad der Erkrankung besteht (van Boekel et al. (2002)). Es wird vermutet, dass RF an der Bildung großer Immunkomplexe beteiligt sind, die das Voranschreiten der Erkrankung begünstigen indem Komplement aktiviert wird und die Zytokinsynthese initiiert wird (Dorner et al. (2004)). Neben den RF konnten aber noch zahlreiche andere Autoantikörper detektiert werden. Dazu zählen Antikörper, die gegen RA33 gerichtet sind, einem Protein des heterogenen nukleären Ribonukleoproteinkomplexes (Hassfeld et al. (1989), Steiner et al. (1992)) und gegen Calpastatin (Despres et al. (1995)), dem natürlichen Inhibitor der Calpaine. Daneben können Antikörper detektiert werden, die sich gegen eine große Anzahl gelenkspezifischer Antigene richten, wie z.B. Kollagen oder Fibronectin, aber auch Antikörper die gegen Phospholipide oder Nichthiston chromosomale Proteine (HMG1 und HMG2) gerichtet sind (van Boekel et al. (2002)). Alle diese Antikörper werden aber auch bei anderen Erkrankungen festgestellt. Daneben gibt es auch eine Vielzahl citrullinierter Antigene, die von Autoantikörpern in RA-Patienten erkannt werden (van Boekel et al. (2002)). Obwohl im Gelenk Ablagerungen von Immunkomplexen gefunden wurden (Ishikawa et al. (1975)) ist noch nicht bewiesen, dass Antikörper gegen die eben beschriebenen Antigene pathologisch relevant sind. Daneben spielen auch Mechanismen der angeborenen Immunität eine Rolle. Seit langem ist bekannt, dass Komplement in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten aktiviert ist und sogar lokal produziert wird (Neumann et al. (2002)).

1.1.2 Die Rolle der MHC-Proteine und der T-Zellen in der Pathogenese der RA

Zwillingsstudien und andere genetische Studien konnten zeigen, dass Menschen, die bestimmte MHC-II Allele exprimieren, prädisponiert sind für die Entwicklung von RA. Mehr als 80% der Rheumapatienten exprimieren HLA-DR1 oder HLA-DR4 Subtypen, die über ein

bestimmtes Sequenzmotiv verfügen, das „shared epitope“ engl.: gemeinsames Epitop (Gregersen et al. (1987)). Dieses Sequenzmotiv beeinflusst wahrscheinlich auch den Schweregrad der Erkrankung, da das Risiko extraartikulärer Manifestationen und Erosionen in Patienten erhöht ist, wenn die Allele für diese MHC-Proteine homozygot vorliegen (Weyand et al. (1992)). Da die einzige bisher bekannte Funktion von MHC-Molekülen die Präsentation von Peptiden ist, die vom T-Zellrezeptor der T-Zellen erkannt werden, kann auf eine direkte Beteiligung der T-Zellen bei der Pathogenese der RA geschlossen werden. Tatsächlich konnten in *in vitro* Proliferationsexperimenten mit T-Zellen von RA-Patienten mögliche Autoantigene identifiziert werden. Dazu zählten insbesondere Kollagen II, Proteoglykane, Aggrekan, Hitzeschockproteine und andere, meist gelenkspezifische, Autoantigene (Firestein (2003)). Trotz allem bleibt die Rolle der T-Zellen umstritten und es wird spekuliert, ob T-Zellen vielleicht nur an der Induktion beteiligt sind, da im entzündeten Synovium nur geringe Mengen der T-zellspezifischen Zytokine IFN- γ und IL-2 gefunden wurden und die T-Zellen nur eingeschränkt proliferieren können (Firestein et al. (1990), Firestein und Zvaifler (1990)). Unterstützt wird diese These durch fehlgeschlagene therapeutische Ansätze, CD4 T-Zellen zu depletieren (van der Lubbe et al. (1995)). Dagegen spricht, dass Patienten erfolgreich mit einem CTLA-4-Ig Fusionsprotein behandelt werden, welches verhindert, dass T-Zellen ein kostimulatorisches Signal bekommen (Kremer et al. (2003), Moreland et al. (2002)). Ein Grund für die eingeschränkte Funktion der T-Zellen in der aktiven Erkrankung liegt möglicherweise in dem vorhandenen inhibitorischen Zytokinmilieu aus IL-10 und TGF- β (Fava et al. (1989), Katsikis et al. (1994), Wahl (1994)).

1.1.3 Die Rolle der Zytokine in der Pathogenese der RA

In den entzündeten Gelenken kann eine Vielzahl von Zytokinen detektiert werden. Diesen Zytokinen kommt im Verlauf der Arthritis wahrscheinlich eine große Bedeutung zu. Vor allem können Zytokine, die von Makrophagen oder makrophagenähnlichen Zellen bzw. Fibroblasten produziert werden, nachgewiesen werden. Dazu zählen IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, TNF- α , GM-CSF und verschiedene Chemokine. Daneben werden aber auch eher T-zellassoziierte Zytokine wie INF- γ und IL-17 produziert. Außerdem werden auch anti-inflammatorische Zytokine wie TGF- β , IL-10 (Fava et al. (1989), Katsikis et al. (1994), Wahl (1994)) und IL-1Ra sowie ein das Zytokinsignal supprimierendes Protein (SOCS3) (Shouda et al. (2001)) im RA Synovium exprimiert. Diese reichen jedoch scheinbar nicht aus, die Synovitis aufzuhalten.

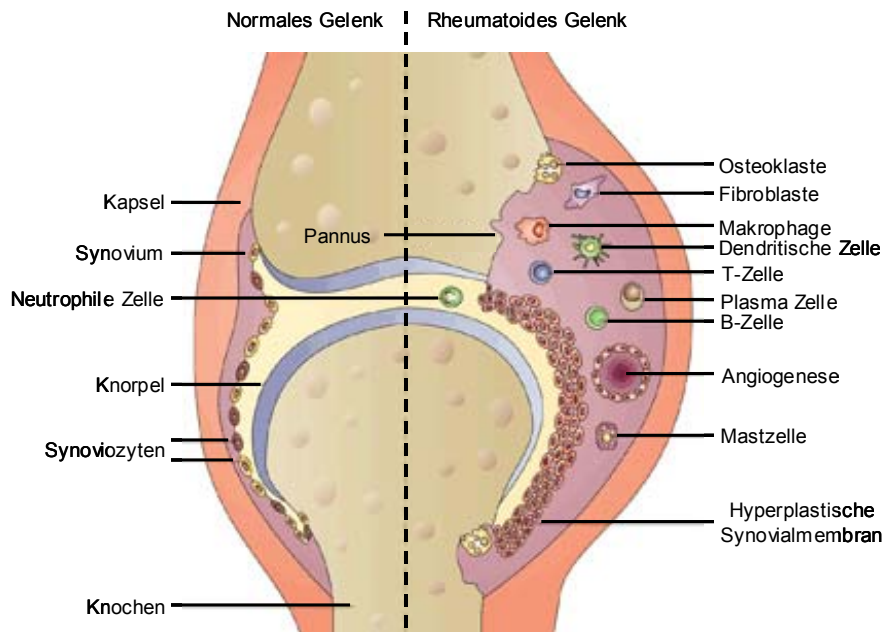


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines normalen Gelenks und seine Veränderung in RA. Ein normales synoviales Gelenk (**links**) besteht aus zwei Knochenenden, die mit Knorpel überzogen sind und von der Gelenkkapsel umgeben sind. Das Synovium ist dünn und die Deckzellschicht besteht aus einer Schicht von 1-3 Synoviozyten. Im Gegensatz dazu ist im rheumatoiden Gelenk (**rechts**) die Synovialmembran entzündet, und eine massive Infiltration durch T-, B- und Plasmazellen, sowie dendritische Zellen, Makrophagen und Mastzellen kann beobachtet werden. Zusätzlich findet Angiogenese statt und es kommt zur Pannusbildung, der Osteoklasten enthält. (Leicht verändert aus: Smolen JS und Steiner G. Nat Rev Drug Discov. 2003 Jun;2(6):473-88)

Es scheint, dass die pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine in einer Art Gleichgewicht miteinander in Verbindung stehen. Zu einem bestimmten Zeitpunkt ist das Gleichgewicht zwischen diesen Zytokinen gestört und eine Entzündung kann sich manifestieren. Die Expression der Zytokine ist sehr komplex reguliert. Durch Zugabe von anti-TNF- α konnte in vitro gezeigt werden, dass die Expression anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 (Brennan et al. (1989)) aber auch von IL-6, IL-8 und GM-CSF reduziert werden konnte. Die Blockierung von IL-1 führt zu einer reduzierten Produktion von IL-6 und IL-8 nicht aber von TNF- α (Feldmann et al. (1996)). Zusätzlich können die meisten Zytokine auf eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und Gewebe einwirken, diese aktivieren oder chemotaktisch wirken. Daher wird die Funktion der Zytokine hier zusammenfassend geschildert. Eine wichtige Funktion der Zytokine ist vor allem die Aktivierung unterschiedlicher Zelltypen, insbesondere Makrophagen, die verstärkt Phagozytose betreiben und weitere pro-inflammatorische Zytokine freisetzen, T- und B-Zellen, die zu Effektor- und Plasmazellen differenzieren und proliferieren. Daneben wirken die Zytokine chemotaktisch und ziehen weitere Effektorzellen, wie z.B. Neutrophile, an den Entzündungsherd. Vielfach wirken sie aber auch direkt auf das Knorpelgewebe und aktivieren Osteoklasten, die an der Knochenresorption beteiligt sind und Chondrozyten, die degradierende Enzyme wie Metalloproteinasen freisetzen. Eine wichtige weitere Funktion der Zytokine liegt auch darin, die Expression von

Zelladhäsionsmolekülen zu induzieren. So konnte die Expression von E-Selektin auf synovialen Endothelzellen und VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen und Makrophagen beobachtet werden (Koch et al. (1991), Tak et al. (1995)). Da viele der genannten Zytokine, insbesondere TNF- α , von Makrophagen exprimiert werden, wird davon ausgegangen, dass Makrophagen die wichtigsten Effektorzellen bei RA sind. Möglicherweise spielen auch die Synoviozyten eine besondere Rolle, die fibroblast- und makrophagenähnliche Eigenschaften haben, die Zytokine produzieren können, phagozytierende Eigenschaften haben und als professionelle antigenpräsentierende Zellen mit T-Zellen interagieren können (Edwards (1994)).

1.1.4 Die Therapie der Rheumatoiden Arthritis

Bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis kommen vier verschiedene Gruppen von Therapeutika zum Einsatz. Es handelt sich dabei um nicht-steroidale Antirheumatika (NSA), Glukokortikoide (GK), langfristig wirkende Antirheumatika (LWA) und seit kurzer Zeit auch Therapeutika biologischen Ursprungs, sogenannte „biologicals“. Bei den nicht-steroidalen Antirheumatika handelt es sich in erster Linie um Therapeutika, die die Prostaglandinsynthese hemmen. Die wichtigsten natürlich vorkommenden GK sind Kortison und Hydrokortison. Bei den LWA wird bei der RA vor allem Methotrexat (MTX) eingesetzt, einem Folsäureantagonisten. Die Gruppe der LWA umfasst neben MTX auch Goldsalze, Sulfasalazin, Penicillinderivate, Chloroquin und andere. Die seit kurzer Zeit eingesetzten biologischen Therapeutika sind gezielt gegen bestimmte Zytokine, wie z.B. TNF- α , gerichtet (Smolen und Steiner (2003)). Infliximab und Adalimumab sind genetisch modifizierte Antikörper, die gegen TNF- α gerichtet sind. Infliximab wird seit 1999 in der Therapie von RA eingesetzt und ist sehr effektiv vor allem in Kombination mit MTX (Elliott et al. (1994), Lipsky et al. (2000), Maini et al. (1998)). Etanercept ist ein Fusionsprotein. Es handelt sich dabei um einen dimeren löslichen TNF-Rezeptor, der mit dem Fc-Teil des IgG₁ fusioniert wurde. Auch Etanercept ist sehr effektiv bei der Blockierung von TNF- α , hat aber im Gegensatz zu Infliximab keine synergistischen Effekte mit MTX und wird daher in Monotherapie angewendet (Weinblatt et al., (1999); Bathon et al. (2000)). Daneben existiert mit Anakinra auch ein schon zugelassener rekombinanter Rezeptor für IL-1 (Bresnihan et al. (1998), Cohen et al. (2002)). Neben den großen Erfolgen in der Behandlung von RA-Patienten haben aber auch diese Therapeutika einige schwerwiegende Nachteile. Die biologischen Therapeutika sind in einigen Fällen immunogen, so dass sie nicht beliebig lang angewendet werden können. Die Behandlung ist sehr teuer und somit nicht jedem zugänglich, und in wenigen Fällen treten schwere Nebenwirkungen auf. Dazu zählt ein erhöhtes Risiko, an Tuberkulose und anderen schweren Infek-

tionen zu erkranken, oder ein erhöhtes Risiko, an Multiple Sklerose oder einem Lupus ähnlichem Syndrom zu erkranken. In Zukunft werden wahrscheinlich noch eine große Anzahl der biologischen Therapeutika auf den Markt kommen. Dabei wird es sich dann möglicherweise um Medikamente handeln, die Metalloproteinasen blockieren, gegen andere Zytokine wie IL-6 und IL-17 oder gegen Oberflächenmoleküle von B- und T-Zellen oder Makrophagen gerichtet sind.

1.2 Tiermodelle der Rheumatoiden Arthritis

Da RA ein so komplexes Syndrom ist, bietet es sich an Tiermodelle der RA zu entwickeln, um den Einfluss bestimmter Gene oder Mechanismen genauer zu untersuchen, aber auch um neue Therapeutika zu testen.

Das erste antigenspezifische Tiermodell der RA war das Kollagen-induzierte Modell, wo heterologes Kollagen II in Ratten injiziert wurde, welche dann eine Arthritis entwickelten (Trentham et al. (1977)). Daneben wurden noch andere Proteine entdeckt, die nach Immunisierung von Mäusen und Ratten eine Arthritis induzieren. Dazu zählen das Kollagen vom Typ IX (Cremer et al. (1998)), Kollagen vom Typ XI, COMP (engl.: cartilage oligomeric matrix protein) (Carlsen et al. (1998)), das Proteoglykan assoziierte Protein Aggrekan (Glant et al. (1998)) sowie das Knorpelglykoprotein gp39 (Verheijden et al. (1997)). Weiterhin existieren auch Tiermodelle, wo die Arthritis allein durch die Gabe von Adjuvantien induziert wird. In der Ratte konnte eine Arthritis durch Immunisierung mit komplettem Freundschens Adjuvans induziert werden (Pearson (1956)). Dazu zählen auch Immunisierungen, die mit kleinen Molekülen wie Muramyl Dipeptiden oder kleinen organische Substanzen wie z.B. Avridin durchgeführt wurden. Diese Substanzen sind zu klein, um als Antigen von T- und B-Zellen erkannt zu werden und induzieren in der Ratte eine Arthritis (Chang et al. (1980), Chang et al. (1981)). Auch in der Maus kann eine Arthritis durch Behandlung mit dem Adjuvans Pristan induziert werden (Wooley et al. (1989)). Durch die neuen Methoden der Gentechnik existieren mittlerweile auch einige transgene Tiermodelle der RA. Transgene Mäuse, die das humane TNF- α überexprimieren, entwickeln eine schwere Arthritis, die unabhängig von T- und B-Zellen ist (Keffer et al. (1991)). Mäuse, die das humane HLA-DR0401 exprimieren, sind auch suszeptibel für die Kollagen-induzierte Arthritis (Rosloniec et al. (1998)). Daneben existiert auch das K/BxN-Modell. In diesem Modell exprimieren Mäuse einen transgenen T-Zellrezeptor, der ein Epitop der Glukose-6-phosphat Isomerase erkennt, was zu einer spontanen Manifestation einer Arthritis führt (Kouskoff et al. (1996), Matsumoto et al. (1999)). Dieses Modell hat große Bedeutung, da es das erste Modell der RA ist, welches zeigt, dass eine

Immunreaktion gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen zu einer organspezifischen Erkrankung wie Arthritis führt. In einem weiteren Modell entwickeln Mäuse aufgrund einer Mutation in der SH2-Domäne von ZAP-70 spontan eine Arthritis, da die Selektion der T-Zellen im Thymus gestört ist (Sakaguchi et al. (2003)). Im Folgenden werden zwei Tiermodelle näher erläutert. Das Kollagen-induzierte Modell ist das Modell, welches bisher am Besten untersucht wurde und in vielen Bereichen der humanen RA ähnelt. Außerdem wird in diesem Modell eine Arthritis durch Immunisierung mit einem Antigen hervorgerufen. Auch in dieser Arbeit ist das Ziel, eine Arthritis durch Immunisierung durch ein Antigen, der G6PI, zu induzieren. Das zweite Modell ist das K/BxN-Modell. Dieses Modell ist die theoretische Grundlage für diese Arbeit, da die G6PI von transgenen T-Zellen erkannt wird und über eine antikörpervermittelte Immunreaktion spontan zu einer Arthritis in diesen Mäusen führt. In dieser Arbeit soll die Rolle der G6PI bei der Pathogenese der RA im Menschen charakterisiert werden und untersucht werden, ob G6PI als ein ubiquitär exprimiertes Antigen auch in nicht-transgenen Mäusen eine organspezifische Erkrankung in Form einer Arthritis induzieren kann.

1.2.1 Das Kollagen-induzierte Tiermodell (CIA)

Das Kollagen-induzierte Tiermodell (CIA) wurde zuerst in Ratten beschrieben. Die intradermale Immunisierung bestimmter Rattenstämme mit Kollagen vom Typ II (CII) aus Hühnern, dem Menschen oder auch aus den Gelenken von Ratten in komplettem Freundschens Adjuvans induzierte eine Arthritis (Trentham et al. (1977)). Später wurde dieses Modell auch in Mäusen und in Primaten etabliert (Cathcart et al. (1986), Courtenay et al. (1980)). In der Maus entwickelt sich die Arthritis ca. 3-4 Wochen nach der Immunisierung mit heterologem CII. Viele susceptible Stämme sind resistent gegen die Arthritisentwicklung, wenn die Immunisierung mit autologem CII durchgeführt wird. Die Stämme, die jedoch eine Arthritis entwickeln, zeigen einen schweren und chronischen Verlauf (Holmdahl et al. (1986)).

1.2.1.1 Die Rolle der MHC-Proteine und der T-Zellen in der CIA

Ähnlich der humanen RA gibt es eine genetische Prädisposition für die Entwicklung der CIA. Mäuse vom H2-q (DBA/1 und B10.Q) und H2-r (B10.RIII) Haplotyp, die die MHC-II Moleküle I-A^q bzw. I-A^r exprimieren sind susceptible für die CIA (Wooley et al. (1981)). Mäuse, die I-A^q exprimieren, erkennen ein immundominantes Epitop des bovinen, Hühner oder humanen CII(257-270) (Kjellen et al. (1998), Rosloniec et al. (1996)). Mäuse, die dagegen I-A^r exprimieren, erkennen eine andere Region des bovinen oder porcinen CII(442-456) (Myers et al. (1995)). Interessanterweise ist die Bindungsgrube des I-A^q Moleküls sehr ähnlich mit der

der DR4 und DR1 Moleküle, die mit RA assoziiert sind (Fugger et al. (1996)). DR4 oder DR1 transgene Mäuse sind suszeptibel für die CIA und erkennen ein Peptid der CII(260-273), das in der gleichen Region wie bei der Bindung an I-A^q liegt (Andersson et al. (1998), Rosloniec et al. (1998), Rosloniec et al. (1997)).

Aufgrund der MHC-II Assoziation lässt sich auf eine direkte Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen schließen. Die Behandlung von Ratten mit Antiserum gegen Thymozyten und von Mäusen mit Antikörpern gegen CD4 verhindert die Entwicklung der Arthritis (Brahm und Trentham (1984), Ranges et al. (1985)). Trotzdem bleibt die Rolle der CD4⁺ T-Zellen kontrovers, da auch Mäuse, die aufgrund einer genetischen Deletion keine CD4⁺ T-Zellen exprimieren, eine Arthritis entwickeln (Tada et al. (1996)). Auch führt der Transfer CII spezifischer T-Zellen in suszeptiblen Mäuse- und Rattenstämmen nur zu der Entwicklung geringer pathologischer Veränderungen in den synovialen Gelenken der Empfänger (Holmdahl et al. (1985b), Trentham et al. (1978)). Trotzdem können während der CIA im Gelenk T-Zellen detektiert werden, die spezifisch für murines CII sind (Svendsen et al. (2004)). CII spezifische CD4⁺ T-Zellen von CIA suszeptiblen Stämmen produzieren nach Restimulation mit dem Antigen *in vitro* große Mengen IL-2 und IFN- γ . Das CII Molekül, welches von den T-Zellen erkannt wird, ist posttranslational modifiziert. Innerhalb des I-A^q, HLA-DR4 und HLA-DR1 restringierten immunodominanten Epitops findet man eine Hydroxylierung von Prolin und Lysinresten, die einhergeht mit einer Glykolisierung. Besonders wichtig scheint dabei der Lysinrest 264 zu sein, der unterschiedlich modifiziert sein kann. Die Immunantwort wird dabei wahrscheinlich dominiert von einer T-Zellantwort gegen die galaktosylierte Form des CII (Malmstrom et al. (2000)). Aufgrund der unterschiedlichen Modifikationen innerhalb des Epitops, ist das T-Zellrepertoire, welches gegen dieses Peptid gerichtet ist, möglicherweise sehr groß. Unterschiede im Schweregrad der Arthritis können auch bei Verwendung rekombinanter CII in Abhängigkeit vom Grad der Glykosylierung beobachtet werden (Myers et al. (1998)). Interessanterweise sind die meisten T-Zellen, die spezifisch für das heterologe CII Epitop (256-270) sind, nicht kreuzreaktiv mit murinem CII. Der Unterschied beruht auf der Aminosäure an Position 266, wo Mäuse eine Aspartatsäure exprimieren, während die Ratte an dieser Stelle eine Glutaminsäure exprimiert (Michaelsson et al. (1992)).

1.2.1.2 Die Rolle der B-Zellen und Autoantikörper in der CIA

Neben den T-Zellen wird auch den B-Zellen eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Im Gegensatz zum T-Zelltransfer ist der passive Transfer der Arthritis durch Transfer von Serum möglich (Englert et al. (1986), Holmdahl et al. (1990)). Dabei ist der Transfer auch in nicht-

suszeptible Stämme möglich (Watson et al. (1987)). Obwohl der Transfer zu einer Arthritis in den Empfängertieren führt, ist die Erkrankung nicht so stark ausgeprägt wie nach Immunisierung mit CII. Jedoch entwickeln nicht nur die suszeptiblen Stämme hohe Antikörpertiter gegen CII sondern auch die nicht-suszeptiblen, was für eine unterschiedliche Qualität der Antikörper in den unterschiedlichen Stämmen spricht (Holmdahl et al. (1988), Wooley et al. (1981)). Die Antikörper, die gegen CII in der CIA gebildet werden, sind hauptsächlich von der IgG₂ Subklasse. Hohe Konzentration von den Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b} können während der Erkrankung gemessen werden. Die IgG₁ Subklasse ist dagegen weniger prominent. In einer Studie wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper untersucht, welche Anforderungen an die Antikörper gestellt werden muss, damit sie in der Lage sind, die Arthritis zu transferieren. Einzelne gegen murines CII gerichtete Antikörper waren nicht in der Lage, die Arthritis zu transferieren. Erst eine Mischung aus drei IgG_{2a} und einem IgG_{2b} Antikörper konnte die Arthritis transferieren, wobei alle Antikörper unterschiedliche Epitope erkannten (Terato et al. (1992)).

1.2.1.3 Die Rolle des Komplements und der Fc-Rezeptoren in der CIA

Ein Effektormechanismus der angeborenen Immunität bei der Antikörper eine Rolle spielen ist das Komplement. Der klassische Weg der Komplementkaskade wird aktiviert, wenn der Komplementkomplex C1q an IgM oder IgG, die z.B. in Immunkomplexen vorhanden sind, bindet. Beim alternativen Weg lagert sich ein Faktor der Komplementkaskade, das C3b Molekül, spontan auf Oberflächen z.B. von Bakterien an und aktiviert darüber die Komplementkaskade. Das Komplement ist sehr wichtig für die CIA. Unter Verwendung des Kobra Venom Faktors kann das Komplement unspezifisch aktiviert werden, was zu einem schnellen Verbrauch der Komplementproteine und somit zum Zusammenbruch des Komplementsystems führt. Eine Behandlung von Ratten mit dem Kobra Venom Faktor führt zu einer verzögerten Manifestation der CIA (Morgan et al. (1981)). Die genetische Deletion von C5, C3 oder Faktor B in DBA/1 Mäusen führt zur Resistenz dieser Mäuse gegen CIA, obwohl sich hohe Antikörpertiter gegen CII bilden (Hietala et al. (2002), Wang et al. (2000)). Das zeigt, dass sowohl der klassische aber auch der alternative Weg der Komplementkaskade beteiligt sind. Daneben spielen über Fc-Rezeptoren vermittelte Effektormechanismen in der CIA eine große Rolle. In der Maus werden Fc γ -Rezeptoren auf allen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Sie stellen eine wichtige Verbindung zwischen Antikörper-Antigen Komplexen und den zellulären Effektormechanismen der Zellen des Immunsystems dar. Eine Aktivierung von Zellen über Fc-Rezeptoren führt zu gesteigerter Phagozytose, der Produktion und Freiset-

zung von Zytokinen, der Endozytose opsonierter Antigene und der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität. In der Maus existieren drei Fc γ -Rezeptoren. Die Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII sind aktivierende Fc γ -Rezeptoren. Beide Rezeptoren besitzen eine gemeinsame γ -Kette, welche über ein ITAM-Motiv verfügt und somit aktivierende Signale in das Zellinnere weiterleitet. Der Fc γ -Rezeptor Fc γ RII ist ein inhibierender Rezeptor, da er über kein ITAM-Motiv verfügt und keine aktivierenden Signale weiterleiten kann. DBA/1 Mäuse, die keine aktivierenden Fc γ -Rezeptoren exprimieren, da sie genetisch deletiert wurden, sind resistent gegen CIA trotz hoher Antikörpertiter gegen CII. Mäuse dagegen, die keinen inhibierenden Fc γ -Rezeptor (Fc γ -RIIB^{-/-}) exprimieren, zeigen einen schwereren Verlauf (Kleinau et al. (2000)).

1.2.1.4 Die Rolle der Zytokine in der CIA

Neben den Antikörpern nehmen auch Zytokine entscheidenden Einfluss auf die CIA. Ähnlich der RA im Menschen ist auch in der CIA das TNF- α von besonderer Bedeutung. Antikörper gegen TNF- α oder der lösliche TNF Rezeptor (TNFR p75) haben therapeutische Effekte, sowohl wenn sie kurz vor der Manifestation der Arthritis oder auch erst kurz danach verabreicht werden (Piguet et al. (1992), Thorbecke et al. (1992), Williams et al. (1992), Wooley et al. (1993)). Daneben konnte aber auch eine wichtige Beteiligung von IL-17 und IL-6 in der CIA gezeigt werden. IL-17 hat einen wichtigen Anteil an der Ausbildung der T-Zellantwort gegen CII und an der IgG_{2a} Produktion der B-Zellen. Mäuse, die eine genetische Deletion für IL-17 besitzen, sind resistent gegen die CIA (Nakae et al. (2003)). Mäuse, die defizient für IL-6 sind, entwickeln keine oder eine verzögerte, mildere Arthritis (Alonzi et al. (1998), Sasai et al. (1999)). IL-6 beeinflusst die Differenzierung von B-, T-Zellen und Makrophagen und aktiviert außerdem Osteoklasten, die an der Knochenresorption beteiligt sind. Somit wird deutlich, dass drei Zytokine, für die auch eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der RA beschrieben wurde, in dem CIA Modell wichtig sind und wahrscheinlich pathologisch die gleichen Effekte haben. Interessantweise kann schon durch das Ausschalten eines dieser Zytokine die Arthritis in der CIA verhindert werden. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass auch in der RA die Zytokine miteinander vernetzte Funktionen haben. Wird dieses Netzwerk an einer Stelle gestört, bricht die pro-inflammatorische Antwort ab.

1.2.2 Das K/BxN-Modell

In dem K/BxN-Modell werden zwei Mausstämme miteinander gekreuzt. Es handelt sich dabei zum Einen um den KRN Stamm. Dieser Stamm exprimiert einen transgenen T-Zellrezeptor

(TZR), der ein Peptid der bovinen Pankreasribonuklease (RNase) im Kontext einer I-A^k Präsentation erkennt. Dieser Stamm wird gekreuzt mit Mäusen des NOD-Stamms (engl.: non obese diabetes), der das MHC-II Molekül I-A^{g7} exprimiert (Abb. 1.3). Der aus dieser Kreuzung resultierende K/BxN Stamm hat einen besonderen Phänotyp (Kouskoff et al. (1996)). Alle Nachkommen dieser Kreuzung entwickeln nach 4-5 Wochen spontan eine schwere, symmetrische Polyarthrititis, die stark der humanen RA ähnelt.

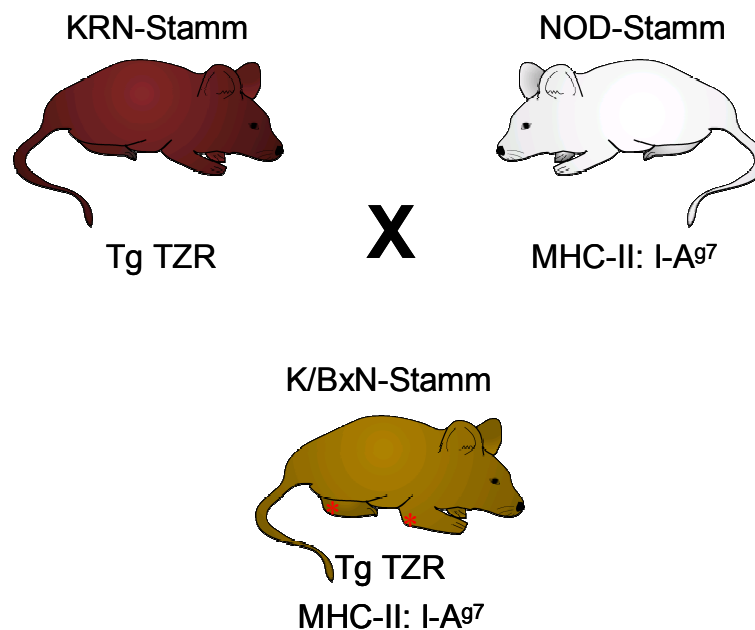


Abb. 1.3: Das K/BxN Mausmodell der rheumatoiden Arthritis. Die K/BxN Mäuse entstehen aufgrund der Kreuzung des KRN Stamms, der transgen für einen T-Zellrezeptor (TZR) ist, der ein Peptid der bovinen Pankreas RNase im Kontext einer I-A^k Präsentation erkennt, und des NOD-Stamms, der I-A^{g7} exprimiert. Die K/BxN Mäuse entwickeln spontan eine antikörpervermittelte Arthritis aufgrund der Erkennung eines Epitops der Glukose-6-phosphat Isomerase durch den transgenen T-Zellrezeptors im Kontext einer I-A^{g7} Präsentation. Dies führt zur Aktivierung der transgenen T-Zellen und später auch der B-Zellen, die hohe Titer pathogener anti-G6PI Antikörper produzieren.

1.2.2.1 Die Rolle des MHC und des transgenen T-Zellrezeptors im K/BxN-Modell

Die transgenen T-Zellen und das MHC-II Molekül I-A^{g7} spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der Arthritis. Die F1 Generation einer KRNxC57BL/6 oder KRNxBALB/c Kreuzung entwickelt keine Arthritis. Wird der KRN Stamm jedoch mit dem C57BL/6 Stamm gekreuzt, der kongen für das MHC-II Molekül I-A^{g7} ist, so entwickeln wieder alle Nachkommen eine Arthritis. Gleiches gilt, wenn BALB/c Mäuse transgen für A_β^{g7} sind und dadurch auch I-A^{g7} exprimieren (Kouskoff et al. (1996)). Nur der transgene TZR und keine zusätzlichen endogenen T-Zellrezeptoren sind für die Arthritisentwicklung verantwortlich. Knochenmark aus KRN Mäusen oder aus KRN Mäusen, die RAG^{-/-} sind, keine B-Zellen besitzen

und ausschließlich T-Zellen haben, die den transgenen TZR exprimieren, wurden in bestrahlte $C\alpha^0/BxN$ Mäuse transferiert, die eine Mutation in der alpha-Kette des TZR aufweisen und daher keine endogenen T-Zellen exprimieren können. Bis auf die Mutation entsprechen die $C\alpha^0/BxN$ Mäuse einer Kreuzung aus C57BL/6 und NOD. Der $C\alpha^0/BxN$ Stamm besitzt keine eigenen T-Zellen aber ein funktionsfähiges B-Zellkompartiment. In beiden Transferexperimenten entwickeln die Tiere einen gleichen Krankheitsverlauf, was zeigt, dass der transgene TZR entscheidend ist (Mangialaio et al. (1999)). Zusätzlich konnte die Bedeutung der $CD4^+$ T-Zellen durch die Blockade von CD4 mit Hilfe eines Antikörper gezeigt werden. Bei einer Blockade von CD4 bis 5 Tage vor der klinischen Manifestation der Arthritis kann die Arthritis verhindert werden. Später hat die Blockade keinen Einfluss mehr (Kouskoff et al. (1996)).

1.2.2.2 Die Rolle der B-Zellen und anti-G6PI Antikörper im K/BxN-Modell

Besonders B-Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper sind von Bedeutung. K/BxN Mäuse, die aufgrund einer μMT^0 Mutation keine reifen B-Zellen besitzen, entwickeln keine Arthritis (Kouskoff et al. (1996)). Der Transfer von Milzzellen aus K/BxN Mäusen in $RAG^{-/-}$ C57BL/6 Mäuse, die keine B- und T-Zellen haben, führt zur Entwicklung einer Arthritis in den Empfängern. Enthalten diese Milzzellen keine B-Zellen ist der Transfer nicht mehr möglich (Korganow et al. (1999)). B-Zellen brauchen für ihre arthritogene Funktion T-Zellhilfe, da K/BxN Mäuse, die CD40 defizient sind, keine Arthritis entwickeln (Korganow et al. (1999)). Die Arthritis kann allein durch geringe Mengen von Serum aus K/BxN Mäusen, die in Empfänger transferiert werden, induziert werden. Die Arthritis verläuft dann jedoch nicht chronisch und nimmt nach 15 Tagen wieder ab (Korganow et al. (1999)). Die Inkubation von Gewebe mit dem Serum der K/BxN Mäuse zeigte eine Bindung von IgG bei einem Protein von 55kDa. Dabei handelte es sich um die Glukose-6-phosphat Isomerase (G6PI) (Matsumoto et al. (1999)). Antikörper, die spezifisch gegen G6PI gerichtet sind, sind in der Lage die Arthritis zu transferieren und transgene T-Zellen aus den KRN Mäusen proliferieren, wenn G6PI im Kontext von I-A^{g7} präsentiert wird (Matsumoto et al. (1999)). Die G6PI ist ein glykolytisches Enzym, welches die Umwandlung von Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat katalysiert. Zusätzlich hat G6PI auch extrazelluläre Funktionen und wirkt außerhalb der Zelle als Zytokin. Proteine, die ursprünglich als Neuroleukin, „autocrine motility factor“ (AMF) und „differentiation and maturation factor“ (DMF) beschrieben wurden, sind identisch mit G6PI (Chaput et al. (1988), Faik et al. (1988), Watanabe et al. (1996), Xu et al. (1996)). In der Milz und anderen lymphatischen Organen kann eine hohe Frequenz von G6PI-spezifischen B-Zellen detektiert werden. Dabei können 40 Tage nach Geburt der K/BxN

Mäuse nur Antikörper vom IgG₁ Isotyp festgestellt werden (Maccioni et al. (2002)). Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass mehrere unterschiedliche Antikörper für den Arthritistransfer gebraucht werden (Maccioni et al. (2002)). Das spricht dafür, ähnlich dem CIA Modell, dass die Bildung von Immunkomplexen von Bedeutung ist. Nur Minuten nach der Injektion von anti-G6PI Antikörpern können diese in den distalen Gelenken der Vorder- und Hinterläufe der Mäuse lokalisiert werden (Wipke et al. (2002)). Außerdem konnte gezeigt werden, dass G6PI auf der Knorpeloberfläche exprimiert wird bzw. sich dort anlagert, was die Hypothese nahe legt, dass die Antikörper große Immunkomplexe mit G6PI im Gelenkspalt bilden (Matsumoto et al. (2002)).

1.2.2.3 Die Rolle des Komplements und der Fc-Rezeptoren im K/BxN-Modell

Das Transfersystem der Arthritis wurde verwendet, um die unterschiedlichen über Antikörper vermittelten Effektorfunktionen zu entschlüsseln. Da der Arthritistransfer in fast jedem Stamm funktioniert, konnten transgene Tiere verwendet werden, die über keinen bestimmten genetischen Hintergrund verfügen mussten. Eine wichtige Effektorfunktion von Antikörpern ist die Bindung an Fc-Rezeptoren. Fcγ^{-/-} Mäuse, die keine funktionellen aktivierenden FcγRI und FcγRIII exprimieren, entwickelten nach Serumtransfer keine Arthritis. Dabei konnte mit FcγRIII^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor entscheidend für die Arthritisentwicklung ist (Ji et al. (2002a)). Mäuse, die FcγRI^{-/-} sind, entwickeln eine Arthritis vergleichbar mit den Wildtyptieren (Ji et al. (2001), Ji et al. (2002a)). In einer Studie zufolge entwickeln FcγRII^{-/-} Mäuse schneller eine Arthritis nach Antikörpertransfer als die Wildtyptiere (Corr und Crain (2002)) während eine weitere Studie behauptet, dass dieser Rezeptor keinen Einfluss auf die Arthritisentwicklung hat (Ji et al. (2001)). Jedoch sind die über den FcγRIII vermittelten Funktionen aber absolut notwendig, um eine Arthritis mit Hilfe von Antikörpern zu transferieren. Neben den Fc-Rezeptoren ist auch das Komplementsystem entscheidend für die Arthritisentwicklung. Eine Blockade des zentralen Komplementproteins C5 mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen C5 verhindert die Arthritisentwicklung nach Serumtransfer bzw. wirkt auch therapeutisch (Ji et al. (2002a)). Auch der A/J Stamm, der defizient für C5 ist, entwickelt keine Arthritis. Mäuse die genetische Deletionen für die Komplementproteine des klassischen Weges der Komplementkaskade C1q oder C4 besitzen, entwickeln eine Arthritis mit einer Inzidenz von 100% (Ji et al. (2002a)). Damit ist der klassische Weg der Komplementkaskade pathologisch nicht relevant. Mäuse dagegen, die keinen Faktor B exprimieren, entwickeln nur in einigen Tieren eine Arthritis. Die dort entwickelte Arthritis ist jedoch sehr schwach (Ji et al. (2002a)). Somit spielt der alternative Weg der Komplementkaskade ein

große Rolle. Die im K/BxN-Modell über das Komplementsystem vermittelte Funktion besteht hauptsächlich über die Aktivierung des C5a-Rezeptors durch C5a. Dieser Effektorweg und die Aktivierung des FcγRIII führt wahrscheinlich zur Aktivierung von Makrophagen, Mastzellen und Neutrophilen, die daraufhin Zytokine wie TNF-α, IL-1 und Chemokine sowie de-gradierende Enzyme freisetzen.

Tatsächlich tragen Neutrophile und Mastzellen entscheidend zur Entwicklung der Arthritis in den K/BxN Mäusen bei. Neutrophile können sehr früh, nach 48 Stunden, in den betroffenen Gelenken nach Serumtransfer nachgewiesen werden, und die Depletion der Neutrophilen mit Hilfe eines Antikörpers verhindert die Arthritsentwicklung (Wipke und Allen (2001)). Die Degranulation von Mastzellen kann schon zwei Stunden nach dem Serumtransfer beobachtet werden, und zwei mastzelldefiziente Mausstämme (SI/SI^d und W/W^v) sind resistent gegen den Arthritistransfer durch Serum (Lee et al. (2002)). Werden in vitro generierte Mastzellen in die W/W^v Mäuse transferiert, so sind auch diese suszeptibel für die mit Serum transferierte Arthritis (Lee et al. (2002)).

1.2.2.4 Die Rolle von TNF-α, IL-1 und IL-6 im K/BxN-Modell

Auch die von Makrophagen, Mastzellen und Neutrophilen produzierten Zytokine TNF-α und IL-1 sind wichtig im Verlauf der Arthritis in den K/BxN Mäusen. Mäuse, die IL-1R^{-/-} sind und keine IL-1α oder IL-1β vermittelten Signale weiterleiten können, entwickeln keine Arthritis nach dem Serumtransfer (Ji et al. (2002b)). Die Rolle von TNF-α ist nicht so eindeutig. Nur ungefähr zwei Drittel der TNF-α^{-/-} Mäuse entwickeln keine Arthritis nach dem Serumtransfer, und die Entwicklung der Arthritis in den suszeptiblen Mäusen war innerhalb dieser Gruppe sehr uneinheitlich bezüglich des Verlaufs (Ji et al. (2002b)). In einer weiteren Studie zeigte die Behandlung von K/BxN Mäusen mit einem anti- TNF-α Antikörper keinen Einfluss auf die Arthritsentwicklung (Kyburz et al. (2000)). Somit wird deutlich, dass TNF-α eine wichtige Rolle spielt aber nicht unabdingbar für Arthritsentwicklung ist. Interessantweise spielt IL-6, welches sowohl im CIA Modell und wahrscheinlich auch in der humanen RA von großer Bedeutung ist, im K/BxN-Modell keine Rolle. Sowohl die IL-6^{-/-} Mäuse aber auch die Wildtypmäuse entwickeln nach Serumtransfer eine Arthritis deren Verlauf und Inzidenz zwischen beiden Stämmen vergleichbar ist (Ji et al. (2002b)).

2 Material

2.1 Mäuse

Die Mäuse wurden soweit nicht anders angegeben unter SPF-Bedingungen (Spezifiziert Pathogen Frei) von der Versuchstierzucht Marienfelde des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) gezüchtet. Folgende Mäuse wurden eingesetzt:

DBA/1	H2-q Haplotyp
DBA/2	H2-d Haplotyp; die Tiere wurden vom Max-Delbrück-Zentrum in Berlin bezogen
AKR	H2-k Haplotyp
B10.A	H2-k Haplotyp
B10.Q	H2-q Haplotyp; die Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen
BALB/c	H2-d Haplotyp
C57BL/6	H2-b Haplotyp
DBA/1 x C57BL/6	H2-q/b; F1 Generation einer DBA/1 und C57BL/6 Kreuzung
SWR	H2-q Haplotyp; die Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen
Mrl/lpr	Diese Mäuse besitzen eine Mutation im <i>Fas</i> Gen. Dadurch wird weniger <i>Fas</i> mRNA exprimiert und die Mäuse leiden an einer SLE ähnlichen Erkrankung.
HLA-DR4mix	Diese Mäuse sind transgen für humanes HLA-DRB0401, humanes CD4 und wurden rückgekreuzt mit H-2I-E negativen Mäusen und exprimieren daher kein endogenes MHC-II. Sie befanden sich auf einem gemischten Hintergrund.
HLA-DR4-Kim	Diese Tiere exprimieren eine MHC-II Chimäre aus dem humanen HLA-DRB0401 Molekül und dem endogen Maus MHC-II. Die Tiere wurden auf den DBA/1 Hintergrund zurückgekreuzt.

2.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid/Bisacrylamid	Biorad
Agar	Roth
Agarose	Gibco
Ammoniumchlorid	Merck

Ampicillin	Roth
APS	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
C5-defizientes humanes Serum	Sigma
CFA	Sigma
CFDA-SE	Molecular Probes
Coomassie G-250	Sigma
DNA aus Kälberthymus	Serva
dNTP	Peqlab
DTT	Sigma
ECL-Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
EDTA	Roth
Essigsäure	Sigma
Etanercept	Immunex
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Biorad
ExtrAvidin-Peroxidase	Sigma
FACS Lysing solution	BD Biosciences
Glycerin	Roth
Glycin	Sigma
H ₂ O ₂	Merck
H ₂ SO ₄	Sigma
HEPES-Puffer	PAA Laboratories
HindIII	New England Biolabs
Hühner Ovalbumin	Sigma
Imidazol	Sigma
Ionomycin	Sigma
IPTG dioxanfrei	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogencarbonat	Merck

Kaninchen CK-M	Sigma
Kaninchen G6PI	Sigma
LB-Medium	Bio101
Magnesiumchlorid	Merck
Marker VI	Vektor pBR3.28 geschnitten mit HinfI/BglII
Methanol	Roth
Microscint	Packard
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
NdeI	New England Biolabs
Ni-NTA	Qiagen
NP-40	ICN
Orange G	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin	PAA Laboratories
Perm buffer II	BD Biosciences
PMA	Sigma
Polyethylenglykol 20000	Merck
Ponceau S	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences
Proteinase K	Sigma
PwoI Polymerase	Peqlab
rekombinantes OspA	TIB MOLBIOL
RPMI-1640	PAA Laboratories
SDS-PAGE Standard (Low range)	Biorad
SEB	Sigma
sensitivierte Schafserthrozyten	Virion
Streptomycin	PAA Laboratories
T4 DNA-Ligase	Peqlab
Taq Polymerase	Roche Diagnostics

TEMED	Sigma
[Methyl-3H]-Thymidin	Amersham Biosciences
TMB-Tabletten	Sigma
Tris	Roth
TrypanBlue solution (0,4%)	Sigma
Tween-20	Merck-Schuchardt
Wasser	Millipore
Zitronensäure	Merck

2.3 Antikörper

2.3.1 Antikörper für die Verwendung im ELISA und Immunoblot

Ziege anti-human IgG-POD	Sigma; spezifisch für die γ -Kette und konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase
Ziege anti-Maus IgG-POD	Sigma; spezifisch für den Fc-Teil von IgG und konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase
Ziege anti-Maus IgG-Biotin	Sigma; mit Biotin konjugiert
Ziege anti-Maus IgM-POD	Sigma; spezifisch für die μ -Kette von IgM und konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase
Ziege anti-Maus IgG ₁	Sigma; spezifisch für die schwere Kette
Ziege anti-Maus IgG _{2a}	Sigma; spezifisch für die schwere Kette
Ziege anti-Maus IgG _{2b}	Sigma; spezifisch für die schwere Kette
Ziege anti-Maus IgG ₃	Sigma; spezifisch für die schwere Kette
Ziege anti-Maus IgM	Sigma; spezifisch für die μ -Kette von IgM
Esel anti-Ziege IgG-POD	Santa Cruz Biotechnology; 0,4mg/ml; konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase
Maus IgG	Jackson Immuno Research; 11,4mg/ml

2.3.2 Antikörper und Sekundärfarbstoffe für die Durchflusszytometrie

Die Antikörper waren teilweise mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Biotin, Indodicarbocyanin (Cy5) oder Allophycocyanin (APC) konjugiert. Streptavidin wurde entweder konjugiert mit PE oder mit Peridinin-Chlorophyll (PerCP) eingesetzt. Vor der Verwendung zur Markierung von Zellen, wurden die Antikörper austitriert.

anti-human CD4-Biotin	BD Bioscience; Klon SK3
anti-human CD69-PE	BD Bioscience; Klon L78
anti-Maus CD3-FITC	Klon 145-2C11; 0,54mg/ml; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt und mit FITC konjugiert
anti-Maus CD4-Cy5	Klon GK1.5; 0,43mg/ml; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt und mit Cy5 konjugiert
anti-Maus CD4-Biotin	Klon GK1.5; 0,52mg/ml; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt und mit Biotin konjugiert
anti-Maus CD8-PE	Klon 53-C6.7; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt und mit PE konjugiert
Maus IgG ₁ -FITC (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon MOPC-21
Maus IgG ₁ -Cy5 (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon MOPC-21
anti-Maus CD25-Biotin	BD Biosciences; Klon 7D4
anti-Maus IL-2-APC	BD Biosciences; Klon JES6-5H4
anti-Maus IL-4-PE	BD Biosciences; Klon 11B11
anti-Maus IL-6-PE	BD Biosciences; Klon MP5-20F3
anti-Maus IL-10-PE	BD Biosciences; Klon JES5-16E3
anti-Maus IL-17-PE	BD Biosciences; Klon TC11-188H10.1
anti-Maus IFN- γ -FITC	BD Biosciences; Klon XM61.2
anti-human IFN- γ -Cy5	Klon 4SB3; 0,6mg/ml wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt und mit PE konjugiert
anti-Maus TNF- α -FITC	BD Biosciences; Klon MP6-XT22
anti-human TNF- α -FITC	BD Biosciences; Klon MAb11
Ratten IgG ₁ -FITC (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon R3-34
Ratten IgG ₁ -PE (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon R3-34
Ratten IgG ₁ -APC (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon R3-34
Ratten IgG _{2b} -FITC (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon A95-1
Ratten IgG _{2b} -PE (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon A95-1

Ratten IgG _{2b} -APC (Isotypkontrolle)	BD Biosciences; Klon A95-1
Streptavidin-PerCP	BD Biosciences
Streptavidin-PE	BD Biosciences
anti-Maus CD16/CD32	Klon 2.4G2; 0,6mg/ml; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt
Beriglobin	Aventis Behring; 160mg/ml
Ratten IgG	Jackson Immuno Research; 11,4mg/ml

2.3.3 Antikörper für *in vivo* Studien

anti-Maus CD25	Klon pC61.5; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt
anti-Maus CD4	Klon YTS191.1; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt
anti-Maus Komplementprotein C5	Klon BB5.1; wurde am DRFZ aus dem Überstand eines B-Zellhybridoms aufgereinigt

2.4 Primer und Vektoren

Alle Primer wurden von TIB MOLBIOL gekauft und auf eine Konzentration von 50µM gebracht.

Primer für die mG6PI-cDNA Amplifikation

mG6PI5: 5' - ACT GAC ATA TGG CTG CGC TCA CCC – 3'

mG6PI3: 5' - ACT GAA GCT TAT TCT AGT TTG GTG TCC C – 3'

Sequenzierungsprimer für den Vektor pQE100S

pQE5: 5' - CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG - 3'

pQE3: 5' - GCC CTG CCA CTC ATC G – 3'

Primer für die Genotypisierung der FcγRIIB^{-/-} Mäuse

Neo: 5' - CTG GTG CTT TAC GGT ATC GCC - 3'

5'EC1 5' - AAA CTC GAC CCC CCG TGG ATC - 3'

3'EC1 5' - TTG ACT GTG TTA AAC GTG TAG - 3'

Primer für die Genotypisierung der FcR γ ^{-/-} Mäuse

Neo: 5' - CTG GTG CTT TAC GGT ATC GCC - 3'

OL4087: 5' - ACC CTA CTC TAC TGT CGA CTC AAG - 3'

OL4081 5' - CTC ACG GCT GGC TAT AGC TGC CTT - 3'

Der Vektor pQE100S ist ein Geschenk von Mark Rosowski von der AG Lauster am DRFZ. Mit Hilfe dieses Vektors kann in Bakterien eine klonierte cDNA mit einer N-terminalen Histidinmarkierung exprimiert werden.

2.5 Patientenseren

Die eingesetzten Patientenseren stammen aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité in Berlin und aus der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Benjamin Franklin in Berlin. Die Seren der gesunden Spender stammen aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum in Berlin.

2.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen**2.6.1 Zellkulturmedien**

Kulturmedium (KM)	RPMI-1640
	10 % FCS
	100 mM HEPES
	50 μ M 2-Mercaptoethanol
	100 U/ml Penicillin
	100 μ g/ml Streptomycin
	RPMI-1640
Waschmedium (WM)	5 % Kulturmedium
LB-Medium	25 Kapseln LB-Medium/l
	100 μ g/ml Ampicillin
Agarplatten	LB-Medium
	15 g/l Agar

2.6.2 Puffer und Lösungen

2.6.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

10x Laufpuffer	30 g/l Tris-HCl 144g/l Glycin 10 g/l SDS
3x Probenpuffer	0,77 g DTT 1 g SDS 4 ml 1M Tris/HCl pH 6,8 5 ml Glycerin 0,3 ml Bromphenolblau ad 17 ml H ₂ O
Coomassie-Lösung	1,6 g Coomassie G-250 500 ml Methanol 500 ml Eisessig
Entfärbelösung	430 ml Methanol 70 ml Eisessig 500 ml H ₂ O

2.6.2.2 Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer (50x TAE)	242 g/l Trisbase 57,1 ml/l 96% Essigsäure 10% EDTA 0,5M pH 8,6
5x Probenpuffer	50 ml Glycerin 2 ml Tris 0,5 M pH 7,5 1 g Orange G ad 100 ml H ₂ O

2.6.2.3 Immunoblot

Transferpuffer	25 mM Tris Base 150 mM Glycin 20% Methanol
----------------	--

Blockpuffer	3% BSA in TBS
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween	10 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20

2.6.2.4 Puffer zur Aufreinigung von rekombinanter G6PI

Lysispuffer	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl 150 mM Imidazol pH 8,0

2.6.2.5 Puffer bei der Aufreinigung von IgG aus murinem Serum

Bindungspuffer	20 mM Na_2HPO_4 mit 20 mM NaH_2PO_4 auf pH 7,0 eingestellt
----------------	---

2.6.2.6 FACS

FACS-Puffer (PBA)	PBS 1 % (w/v) BSA 0,5 % NaN_3
Lysis-Puffer	10 mM KHCO_3 155 mM NH_4Cl 0,1 mM EDTA

PFA	2 % in PBS
Saponin-Puffer	0,5 % (w/v) Saponin in PBA

2.6.2.7 ELISA

Bindungspuffer	PBS
Blockpuffer	PBS 0,5 % BSA
Inkubationspuffer (PBT)	PBS 0,5 % BSA 0,05 % Tween-20
Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween-20
TMB-Puffer	0,2 M Na ₂ HPO ₄ 0,1 M Zitronensäure auf pH 5,0 eingestellt

2.6.2.8 Andere Puffer

Proteinase K Verdauungspuffer	0,5 mg/ml Proteinase K 0,1% SDS 0,1 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA
10 x PCR-Puffer	Peqlab
Puffer H	Boehringer Mannheim
10x Ligationspuffer	Peqlab
Gelatin Veronal Puffer (GVB ²⁺)	Sigma

2.7 Verbrauchsmaterialien

Acrylküvetten	Roth
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce

Combitips, Reaktionsgefäße	Eppendorf
Dialyseschlauch	Roth
Filterplatten (Unifilter GF7B), Abdeckklebeetiketten, Versiegelungsfolie	Packard
Handschuhe, Kimwipes	Kimberly Clark
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Kanülen, Spritzen	HSW, Braun,
MiniCollect Röhrchen	Greiner
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen, Zellkulturflaschen,	Corning/Costar
96- und 48-Muldenplatten, ELISA Platten, Reagents Reservoir, Plastikpipetten	
Phosphohexose Isomerase Kit	Sigma
QIAprep [®] Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick [®] Gel extraction Kit	Qiagen
Quarzküvette	Hellma
Sterifilter 0,45µm und 0,2µm, 15- und 50 ml	Saarstedt
Propylenröhrchen	
Whatman Filterpapiere,	Schleicher-Schuell
Nitrozellulosemembran Optitran 0,45µM	
Zellsiebe (cell strainer) 70µM	Falcon

2.8 Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer	Peqlab
β-Szintillationszähler	Topcount NXT von Packard
Durchflusszytometer	FACCalibur von Becton Dickinson
ELISA-Lesegerät	Spectra Max 250 von Molecular Devices
Feinwaage	Sartorius
French press	American Instruments
Gel/Blot-Dokumentationsgerät	Gel Doc 2000 von Biorad
Heizblock	Roth

Inkubatoren mit Schüttler	TH 25 von Edmund Bühler B6 von Heraeus BB16CU von Heraeus
Kühlschränke und Gefrierschränke	Liebherr Heraeus Herafreeze
Magnetrührer	IKA RCTbasic
Mikroskop	Zeiss
Netzgerät	Biorad PowerPac 300
PCR-Maschine	Perkin Elmer Gene Amp 2400
pH-Meter	Knick Calimatic 766
Photometer	UV-1202 von Shimadzu
Pumpe	Miniplus2 von Gilson
Schreiber	Colora Recorder 1100
SDS-PAGE	Biorad
Elektrophoresekammer	
Sterilbank	HeraSafe von Heraeus
Trockenschrank	T6030 von Heraeus
Ultraschallgerät	Sonoplus HD70 von Bandelin
UV-Meter	Uvicord SII von Pharmacia
Zellerntegerät	Harvester Filtermate 196 von Packard
Zentrifugen	Megafuge 1.0 von Heraeus Megafuge 1.0R von Heraeus Biofuge 13R von Heraeus Biofuge 22R von Heraeus Biofuge pico von Heraeus RC-5B von Sorvall

3 Methoden

3.1 Methoden der Mikrobiologie

3.1.1 Kultivierung von *E.coli* BL21(DE3)

Der mit dem Vektor pQE100S-hG6PI bzw. pQE100S-mG6PI transformierte *E.coli* Stamm BL21(DE3) wurde bei 37°C in LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin kultiviert. Aus dem bei -70°C gelagerten Bakterienvorrat wurden 100ml LB-Medium/Amp angeimpft und über Nacht im Schüttler kultiviert. Dazu wurde mit Hilfe einer abgeflammt und noch heißen Inokulationsöse in die gefrorene Bakteriensuspension gestochen und eine kleine Menge der Bakteriensuspension in das Medium überführt

3.1.2 Expression der rekombinanten humanen und murinen G6PI

Methode: Auf dem Plasmid pQE100S ist das Gen *lacIq* lokalisiert. Dieses Gen codiert für das lac Repressor Protein, welches nach Expression an den lac-Operator bindet und dadurch die Expression der durch den lac-Operator kontrollierten Gene inhibiert. Nach Zugabe von Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG) wird diese Inhibition aufgehoben. IPTG bindet an den Repressor und induziert eine Konformationsänderung, wodurch der Repressor vom Operator dissoziiert und das Gen exprimiert wird.

Durchführung:

Die über Nacht kultivierte Bakterienkultur wurde in 2l LB-Medium/Amp transferiert und erneut bei 37°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD) von 0,55 - gemessen bei 600nm – wurde die Bakterienkultur mit 4 ml IPTG (1M) versetzt. Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C für 3h wurde die Bakteriensuspension bei 4°C und 5000g für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet für die weitere Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Klonierung der murinen G6PI-cDNA in pQE100S

Die cDNA der murinen G6PI wurde aus einer murinen cDNA, die aus dem Herzen der Maus generiert wurde, über die Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen HindIII und NdeI geschnitten und in den ebenfalls geschnittenen Vektor pQE100S ligiert. Folgender Ansatz wurde für die Amplifikation der murinen G6PI cDNA verwendet:

PCR-Ansatz	
10x Puffer	5µl
Primer mG6PI5	50 pmol
Primer mG6PI3	50 pmol
DNTP's	0,2 mM
murine cDNA	0,1µg
MgCl ₂	1,5 mM
Taq/PwoI (3:1)	0,5µl (4U/µl)
Aqua dest.	ad 50µl

PCR-Programm

94° C	4 min	} 32 Zyklen
94° C	0:45 min	
58° C	1 min	
72° C	1:45 min	
72° C	10 min	
4° C	∞	

Nach der Amplifikation wurde die amplifizierte cDNA der murinen G6PI über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Agarosegel mit dem QIAquick® Gel extraction Kit isoliert. Die cDNA und der Vektor pQE100S wurden wie folgt mit den Restriktionsenzymen HindIII und NdeI bei 37°C über Nacht geschnitten.

pQE100S	
10x Puffer H	5µl
HindIII	20 U
NdeI	20 U
pQE100S	2,5µg
Aqua dest.	ad 50µl

mG6PI cDNA	
10x Puffer H	5µl
HindIII	20U
NdeI	20U
mG6PI cDNA	28µl Eluat
Aqua dest.	ad 50µl

Anschließend wurde die DNA erneut über ein Agarosegel aufgetrennt und mit dem QIAquick® Gel extraction Kit isoliert. Die isolierten DNA Fragmente wurden mit Hilfe der T4 Ligase über Nacht bei 16°C ligiert und der generierte Vektor pQE100-mG6PI über einen Hitzeschock von 45s bei 42° C in den Bakterienstamm BL21(DE3) transformiert und auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert. Für die Ligation wurde folgender Ansatz benutzt:

Ligation von pQE100s und der mG6PI cDNA	
pQE100S (HindIII/NdeI verdaut)	1µl Eluat
mG6PI cDNA (HindIII/NdeI verdaut)	4µl Eluat
T4 DNA Ligase	1 U
T4 10x Puffer	1µl
Aqua dest.	ad 10µl

Von 10 Kolonien wurden aus einer 3ml Kultur mit dem QIAprep® Miniprep Kit Plasmide isoliert und das ligierte cDNA Fragment über einen HindIII/NdeI Inkubation ausgeschnitten. Die Größe des Fragments wurde auf einem Agarosegel kontrolliert. Sowohl die für die Ex-

pression von rhG6PI als auch von rmG6PI verwendeten Vektoren in dieser Arbeit wurden einer Doppelstrang-Sequenzierung durch die Firma AGOWA unterzogen. Der Vektor pQE100S-hG6PI wurde in der Diplomarbeit kloniert und lag daher schon vor.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

1g Agarose wurde mit 100ml TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle für ca. 1min bei 600W aufgeköcht. Nachdem die Agarose bis auf Handwärme abgekühlt war, wurden 5µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zugesetzt und das Gel gegossen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstanden. Die Proben wurden im Verhältnis 7:1 mit Probenpuffer versetzt, aufgetragen und bei 100V aufgetrennt. Als Laufpuffer diente wieder TAE-Puffer. Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente durch UV-Licht sichtbar gemacht, bei Bedarf ausgeschnitten, dokumentiert und auf einem elektronischen Datenträger gesichert. Um die Größe der detektierten Banden bestimmen zu können, wurden zusätzlich immer auch ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen.

3.3 Methoden der Proteinbiochemie

3.3.1 Aufreinigung der G6PI

Methode: Das im *E.coli* Stamm überexprimierte G6PI enthält am N-Terminus eine Markierung aus 6 Histidinresten. Diese Histidinreste koordinieren mit Ni^{2+} , welches mit Säuren der Matrix koordiniert ist und einen Chelatkomplex bilden. Dadurch werden die mit Histidin markierten Proteine an die Matrix gebunden. Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer wird das Protein von der Säule verdrängt und kann eluiert werden.

Durchführung: Die gesamte Aufreinigung wurde auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Bakterienpellet der 2l Expressionskultur (siehe 3.1.2) wurde mit 20ml Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien über eine french press aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 1h bei 13000g und 4° C zentrifugiert, um die schweren Zellfragmente zu pelletieren. Der Überstand wurde auf 100ml mit Lysispuffer verdünnt und über eine mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA Säule (5ml) gegeben. Die gesamte Aufreinigung wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min durchgeführt. Anschließend wurde die Säule mit 100ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit ca. 50ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Proteinlösung im Dialyseschlauch wurde in PEG20000 eingelegt und dadurch aufkonzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde steril filtriert und die Konzentration über das BCATM Protein Assay Kit bestimmt. Die Reinheit der Präparation wurde in einem 12%igen SDS-Gel überprüft.

3.3.2 IgG-Aufreinigung

Methode: Die Aufreinigung der IgG-Antikörper aus dem Serum von arthritischen Mäusen erfolgte über Affinitätschromatographie, wobei Protein G an die Säulenmatrix gebunden war. Protein G ist ein Zelloberflächenprotein aus Streptokokken der G-Klasse und hat eine hohe pH-abhängige Affinität zu murinen IgG-Antikörpern. Durch Absenken des pH-Wertes nimmt die Affinität ab und an Protein G gebundene Antikörper können eluiert werden.

Durchführung: Serum aus arthritischen Mäusen wurde gewonnen und gemischt. 15ml des Serums wurden bei 4°C für 30min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 150ml mit Bindungspuffer aufgefüllt und über eine mit 200ml Bindungspuffer äquilibrierte Sepharose Säule gegeben, die mit Protein G gekoppelt war. Die Säule wurde anschließend mit 200ml Bindungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,1M Glycin pH 2,8 über eine automatisierte Antikörperreinigungsanlage, die über einen UV-Detektor und ein Schreibgerät verfügte. Das Eluat wurde sofort mit 1M Tris/HCl pH 9,0 neutralisiert, über Nacht gegen PBS dialysiert, mit PEG20000 aufkonzentriert und steril filtriert. Die Konzentration der Antikörper wurde über die Absorption bei 280nm photometrisch bestimmt.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Reinheit der G6PI Aufreinigung sowie der kommerziellen G6PI Präparation aus dem Muskel der Kaninchen wurde über SDS-PAGE bestimmt. Die SDS-PAGE wurden zusätzlich für die Immunoblotanalyse der Patientenseren eingesetzt. Standardmäßig wurde ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel gegossen:

Trenngel 12%	
30% Acrylamid/Bisacrylamid	8,0ml
Aqua dest.	6,6ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,0ml
10% SDS	0,2ml
10% APS	0,2ml
TEMED	8µl

Sammelgel 5%	
30% Acrylamid/Bisacrylamid	0,83ml
Aqua dest.	3,4ml
1,0 M Tris pH 6,8	0,63ml
10% SDS	0,05ml
10% APS	0,05ml
TEMED	5µl

Die Proteinproben (5-10µg) wurden im Verhältnis 1:3 mit reduzierenden Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95° C denaturiert und anschließend aufgetragen. Um die Größe der Banden später bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Proteinstandard aufgetragen. Der Gellauf wurde bei 200V durchgeführt. Nachdem der Farbmaler das Gel verlassen hatte, wurde der Lauf gestoppt und die Gele über Nacht unter Schütteln mit einer Coomassie-Färbelösung an-

gefärbt. Anschließend wurden die Gele kurz mit Wasser gespült und solange in Entfärberlösung geschüttelt bis das Ergebnis zufriedenstellend war. Die Gele wurden dokumentiert und auf einem elektronischem Datenträger festgehalten. Gele, die für die Immunoblots eingesetzt wurden, wurden nicht gefärbt.

3.3.4 Immunoblot

Die Proteine der rekombinanten humanen G6PI (rhG6PI) und der kommerziellen Kaninchen G6PI Präparation wurden über ein 12%iges SDS-Gel aufgetrennt (siehe 3.2.4). Die Proteine in diesem Gel wurden auf Nitrozellulosemembran transferiert. Dieser Transfer wurde in Transferpuffer in einem speziellen Transfereinsatz für die SDS-Gelkammer vorgenommen, in dem das Gel in direktem Kontakt zur Nitrozellulosemembran umgeben von Whatmanfilterpapieren stand. Der Transfer wurde für 1h bei 100V durchgeführt. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt und die Markerbanden markiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde mit 3% BSA in TBS Puffer unter Schütteln inkubiert und anschließend dreimal mit TBS/Tween-Puffer 10min bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde mit 1:200 verdünnten Patientenseren in TBS/BSA/Tween Puffer inkubiert und erneut dreimal mit TBS/Tween Puffer für 10 min gewaschen. Dann wurde die Membran mit 1:5000 verdünntem Ziege-anti-human-IgG Antikörper, der mit Peroxidase konjugiert war, in TBS/BSA/Tween Puffer für 1h bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gewaschen. Die Membran wurde leicht angetrocknet. Dann wurde die Membran für ca. 1min in frisch ange-setzte ECL-Detektionsreagenz eingelegt und anschließend vorsichtig in Folie eingewickelt. Die spezifische Bindung von IgG Antikörpern wurde in der Dunkelkammer nach Belichten und Entwickeln eines speziellen ECL-Films detektiert.

3.3.5 Enzymaktivität der G6PI

Methode: Die G6PI katalysiert die Umwandlung von Fruktose-6-phosphat zu Glukose-6-phosphat. Die Enzymaktivität der G6PI wurde indirekt über die Oxidation von Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglukonat bestimmt. Diese Reaktion wird von der Glukose-6-phosphat Dehydrogenase katalysiert bei der gleichzeitig NAD zu NADH reduziert wird. Die Umwandlung von NAD zu NADH kann photometrisch bei 340nm verfolgt werden. Nach dem Gesetz von Lambert und Beer ist die Konzentrationsänderung von NADH proportional zur Absorptionsänderung. Dabei gilt dann:

$$\Delta c_{NADH} = \frac{\Delta A_{340nm}}{\epsilon_{NADH} \cdot d} = \frac{\Delta A_{340nm} \cdot mmol \cdot cm}{6,22 \cdot l \cdot 1 \cdot cm} = \frac{\Delta A_{340nm}}{6,22} \cdot \frac{mmol}{l}$$

Δc_{NADH} = Konzentrationsänderung der NADH in mmol/l

d = Schichtdicke der Küvette in cm

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient des NADH in $\frac{l}{mmol \cdot cm}$

ΔA_{340nm} = Absorptionsänderung bei 340nm pro Minute

Eine Einheit (U) ist dabei als die Enzymmenge definiert, die 1 μ mol Fruktose-6-phosphat zu Glukose-6-phosphat pro Minute bei 25°C umsetzt. Je nachdem, ob die U/ml Serum oder die U/mg Protein bestimmt werden sollten, musste die entsprechende Verdünnung des Serums oder eingesetzte Menge Enzym mit einberechnet werden.

Durchführung: Die Enzymaktivität der G6PI im Serum unterschiedlicher Mausstämmen bzw. der rekombinant hergestellten Proteine wurde mit einem Phosphohexose Isomerase Kit ermittelt. Die Reaktionslösung wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität im Mausserum wurden 500 μ l der Reaktionslösung in eine Quarzküvette überführt. Der Beginn der Messung wurde durch Zugabe von 10 μ l Serum markiert. Anschließend wurde die Änderung der Absorption bei 340nm über 5min photometrisch verfolgt. Über die Zunahme der Absorption/min unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die Enzymaktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der rekombinanten G6PI wurde die G6PI mit PBS auf eine Konzentration von 6 μ g/ml gebracht. 666 μ l der Reaktionslösung wurden erneut in der Quarzküvette mit 22 μ l G6PI gemischt und die Absorption bei 340nm für 6min photometrisch verfolgt und die Enzymaktivität bestimmt.

3.3.6 MALDI-MS Analyse

Ein Protein der kommerziellen G6PI Präparation aus dem Muskel von Kaninchen wurde über das Massenspektrum des Proteins nach MALDI-MS (engl.: matrix assisted laser desorption-ionization mass spectrometry) Analyse identifiziert. Die G6PI Präparation wurde über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (siehe 3.2.4 und 3.2.5). Die entsprechende Proteinbande im Gel bzw. auf der Membran wurde ausgeschnitten und der MALDI-MS Analyse zugeführt. Die gesamte weitere Aufarbeitung inklusive Trypsinverdau des Proteins, Aufnahme des Massenspektrums und Auswertung des PMF (engl.: peptide mass fingerprint) wurde von Monika Schmidt und Dr. Peter R. Jungblut am Max-Planck Institut für Infektionsbiologie in Berlin durchgeführt.

3.4 Methoden der Zellbiologie

3.4.1 Zellkultur

Bei der Kultivierung von Zellen wurden bestimmte Verhaltensregeln beachtet, um steriles Arbeiten zu gewährleisten. Zur Gewinnung von Zellen aus der Milz und den Lymphknoten wurden die Scheren und Pinzetten für 5min abgekocht und anschließend in 70% Ethanol eingelegt. Sämtliche andere Geräte, Puffer und Medien wurden autoklaviert oder sterilfiltriert. Beim Umgang mit eukaryotischen Zellen wurde ausschließlich unter der Sterilbank gearbeitet. Die eukaryotischen Zellen wurden immer bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% sowie einer CO₂ Konzentration von 5% mit Kulturmedium (KM) kultiviert.

3.4.2 Gewinnung von Zellen aus der Milz und den Lymphknoten

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Bevor die Milz und Lymphknoten entnommen wurden, wurde der Körper der Maus mit 70% Ethanol besprüht. Anschließend wurden die Mäuse sezirt und die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Organe wurden in ein Organsieb überführt, mit Hilfe eines Stempels zerrieben und die Zellsuspension in Waschmedium (WM) überführt. Das Homogenat wurde nun bei 470g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und das Lymphknotenhomogenat mit KM aufgefüllt, durch ein 70µm Zellsieb gegeben und nach Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer auf eine bestimmte Konzentration gebracht. Auch das Milzhomogenat wurde resuspendiert. Zusätzlich wurden jedoch die Erythrozyten durch Zugabe von 10 ml Lysispuffer und 8 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Während der Lyse wurde die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb gegeben, um Zelldebris zu entfernen. Danach wurde die Lyse durch Zugabe von 30ml Waschmedium unterbrochen und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und mit KM aufgefüllt.

3.4.3 Gewinnung von Zellen aus dem Blut

Blut wurde aus Mäusen gewonnen und in einem MiniCollect[®] Röhrchen gesammelt (siehe 3.5.3). Das Blut wurde in Polystyrenröhrchen überführt und mit 3ml Lysispuffer versetzt und für 8 min inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurden die Röhrchen mit PBA (PBS/BSA/Azid) aufgefüllt und für 5min bei 470g und 4°C zentrifugiert. Je nachdem, ob noch viele Erythrozyten im Pellet vorhanden waren, wurden die Zellen resuspendiert und erneut mit Lysispuffer versetzt und zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBA gewaschen und konnten dann für die durchflusszytometrische Messung weiter verarbeitet werden.

3.4.4 Proliferationstest

Mit Hilfe des Proliferationstestes kann festgestellt werden, ob Zellen einer Lymphknotensuspension nach Stimulation mit einem Antigen proliferieren. Die Proliferation der Zellen wird dabei über den ^3H -Thymidineinbau verfolgt, der im β -Szintillationszähler gemessen werden kann. 2×10^5 Zellen der inguinalen Lymphknoten der untersuchten Mausstämme wurden in 200 μl KM für 72h in den Mulden einer 96 Muldenplatte entweder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ rhG6PI oder mit PBS bei 37°C im Inkubator stimuliert. Für die letzten 18h wurde der Kultur zusätzlich 1 μCi ^3H -Thymidin zugefügt und weiter bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nun mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Szintillationsfilterplatten transferiert. Die Filterplatten wurden bei 65°C für 20 min getrocknet. Auf jeden Filter wurden 40 μl Szintillationsflüssigkeit pipettiert. Anschließend wurden die Filterplatten versiegelt und im β -Szintillationszähler für 1min / Filter gemessen. Die Proliferation wurde in Form des Stimulationsindex angegeben. Der Stimulationsindex ist der Quotient aus den gemessenen mittleren Dreifachmessungen nach Restimulation mit rhG6PI und den gemessenen mittleren Dreifachmessungen der unstimulierten mit PBS kultivierten Kultur.

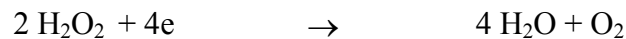
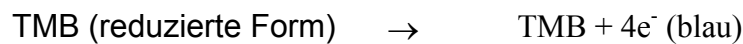
3.4.5 Komplementaktivitätstest

Beim Komplementaktivitätstest wurde die Fähigkeit des murinen Serums zur Lyse sensitivierter Erythrozyten aus dem Schaf nach Depletion des Komplementproteins C5 untersucht. Die zu testenden Seren behandelter und unbehandelter Mäuse wurden 1:10 in GVB²⁺ Puffer verdünnt. Für die Lyse wurde auch humanes Serum benötigt. Da der Erfolg der C5 Depletion untersucht wurde, wurde C5 defizientes humanes Serum verwendet und 1:10 in GVB²⁺ Puffer verdünnt. Pro Messung wurden als Dreifachbestimmung 50 μl einer Suspension aus sensitivierten Schafserythrozyten wurde in eine Mulde einer rundbodigen 96-Muldenplatte überführt. Zusätzlich wurden zu den 50 μl der Erythrozyten je 25 μl des verdünnten murinen Serums als auch des verdünnten humanen Serums zugegeben. Zur Kontrolle wurden die murinen und das humane Serum auch einzeln zu den Erythrozyten gegeben und auf 100 μl mit GVB²⁺ aufgefüllt. Um die Hintergrundlyse zu bestimmen, wurden die Erythrozyten ausschließlich mit GVB²⁺ auf 100 μl aufgefüllt. Für die maximale Lyse wurden die Erythrozyten mit 50 μl NP-40 (0,1%) gemischt. Anschließend wurde die Platte für 45min bei 37°C im Inkubator inkubiert und dann für 10min bei 800g zentrifugiert. 50 μl des Überstandes wurden abgenommen und bei 415nm photometrisch vermessen. Die Lyse berechnete sich wie folgt:

$$\%Lyse = 100 \times \left(\frac{A_{415} \text{Testserum} - A_{415} \text{Hintergrundlyse}}{A_{415} \text{Lyse}_{\text{max}} - A_{415} \text{Hintergrundlyse}} \right)$$

3.4.6 ELISA

Methode: Antikörper, die spezifisch für ein Antigen sind, können über einen ELISA (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) detektiert werden. Beim ELISA wird das nachzuweisende Antigen an die Matrix einer speziellen 96-Muldenplatte gebunden. Antikörper aus Serum, die das Antigen spezifisch binden, verbleiben auf der Platte. Der Nachweis dieser Bindung erfolgt über einen zweiten Antikörper, der spezifisch Antikörper eines Isotyps einer Spezies erkennt und mit Biotin oder direkt mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Biotin besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Streptavidin, das an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt vorlag. Diese Peroxidase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff in Gegenwart des Elektronendonors Tetramethylbenzidin (TMB). Der Elektronendonator wird bei dieser Reaktion oxidiert, was durch einen Farbumschlag sichtbar wird.



Insgesamt wurden unterschiedliche ELISA in dieser Arbeit durchgeführt. Bei allen ist der allgemeine Ablauf gleich gewesen. Daher folgt erst eine Beschreibung der mit Mausserum durchgeführten G6PI ELISA. Anschließend wird auf die unterschiedlichen Antigene und Besonderheiten bei der Durchführung der anderen ELISA eingegangen.

Durchführung: 100 µl der rhG6PI oder rmG6PI (5µg/ml) in PBS (Beschichtungslösung) wurde in jede Mulde einer 96-Muldenplatte für ELISA überführt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde dann ausgeschüttelt und die Platten auf Zellstoff kurz abgeklopft. Unspezifische Bindungen wurden danach durch Zugabe von 100 µl Blockierungspuffer (PBS/BSA) und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 100µl Serum in unterschiedlichen Verdünnungen (1:100 – 1:409.600) als Triplets in PBT (PBS/BSA/Tween) inkubiert. Nach 1h wurden die Platten erneut dreimal gewaschen. Zur Detektion wurden die Platten mit 100 µl eines Ziege-anti-Maus-IgG Antikörpers in PBT inkubiert. Dieser Antikörper war entweder direkt mit einer Peroxidase konjugiert (Verdünnung 1:1.000) oder mit Biotin (Verdünnung 1:500) gekoppelt. Im Fall des biotinylierten Antikörpers wurde die Platte erneut gewaschen und mit 100µl ExtrAvidin® (dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex) in PBT bei einer Verdünnung von 1:1.000 für 30 min inkubiert. Der Farbreaktion erfolgte nach gründlichem Wa-

schen durch Zugabe von 100µl einer frisch hergestellten Lösung aus 10 ml TMB-Puffer pro Tablette TMB und 4 µl 30%igem H₂O₂. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50µl 12,5%iger H₂SO₄ gestoppt, nachdem die Negativkontrolle anfing, blau zu werden. Durch Zugabe von H₂SO₄ erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb und die Absorption wurde in einem ELISA-Meßgerät bei 450 nm bestimmt.

Isotypspezifischer ELISA gegen rhG6PI mit murinen Seren:

Die ELISA Platten wurden mit rhG6PI (5µg/ml) in PBS beschichtet. Das Mausserum wurde seriell von 1:100 – 1:409.600 verdünnt. Für die Detektion der unterschiedlichen Isotypen wurden die Platten mit Ziege-anti-Maus-IgG₁, -IgG_{2a}, -IgG_{2b}, -IgG₃ und IgM Antikörpern (1:1.000) in PBT inkubiert. Die Bindung der isotypspezifischen Antikörper wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten Esel-anti-Ziege-IgG Antikörper (1:3.000) in PBT detektiert.

G6PI und Kreatinkinase M-Kette (CK-M) ELISA mit humanem Serum:

Die ELISA Platten wurden mit rhG6PI, kommerziellen Kaninchen G6PI oder kommerzieller Kreatinkinase M-Kette in PBS inkubiert. Die Proteinlösung hatte dabei eine Konzentration von 5µg/ml. Die eingesetzten humanen Seren waren 1:50 in PBT verdünnt. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten Ziege-anti-human-IgG Sekundärantikörper, der 1:5.000 in PBT verdünnt wurde.

Kollagen II ELISA mit Mausserum:

Die ELISA Platten wurden mit murinem Kollagen II (4µg/ml) in PBS beschichtet. Die Seren wurden seriell von 1:100 – 1:409.600 in PBT verdünnt. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG Sekundärantikörper, der 1:1.000 in PBT verdünnt wurde.

Rheumafaktoren (anti-IgG-Maus-IgM)

Die ELISA Platten wurden mit murinem IgG (2µg/ml) in PBS beschichtet. Die Seren wurden seriell von 1:100 – 1:6.400 in PBT verdünnt. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgM Sekundärantikörper, der 1:5.000 in PBT verdünnt wurde.

anti-dsDNA- ELISA

Die ELISA Platten wurden zuerst für 24h mit PBS/BSA (1mg/ml) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit doppelsträngiger DNA (10µg/ml) in PBS für weitere 24h

beschichtet. Die Seren wurden seriell von 1:100 – 1:6.400 in PBT verdünnt. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG Sekundärantikörper, der 1:1.000 in PBT verdünnt wurde.

3.4.7 Durchflusszytometrie

3.4.7.1 Methode

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenmolekülen oder Zytokinen unterschieden und getrennt werden. Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte monoklonale Antikörper gegen verschiedenen Oberflächenproteine oder Zytokine werden für die Markierung der Zellen eingesetzt. Bei der Analyse sind die Zellen umgeben von einem Flüssigkeitströpfchen und passieren einen fokussierten Laserstrahl. Das von den Zellen in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht wird als sogenanntes Vorwärtstreulicht (engl.: forward scatter FSC) gemessen. Das hinter dem Strahl gemessene Licht ist das Seitenstreulicht (engl.: side scatter SSC) und das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-Fluoreszenz-Konjugate. Das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluorochrome wird durch optische Filter nach Wellenlängen getrennt und von Lichtsensoren verarbeitet. Insgesamt können von dem Messgerät 6 Parameter gleichzeitig bestimmt werden. Über das Vorwärtstreulicht und Seitenstreulicht werden Aussagen über die Größe und Granularität gemacht. Der in dieser Studie verwendete FACSCalibur kann zusätzlich noch 4 Fluoreszenzfarbstoffe analysieren. Die Fluoreszenzintensität 1 (FL1) ist proportional zur Intensität der Anfärbung mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC). FITC hat ein Absorptionsmaximum bei 495 nm und eine Emissionsmaximum bei 519 nm. FL2 ist proportional zur Anfärbung mit R-Phycoerythrin (PE), welches ein Absorptionsmaximum bei 498 nm und Emissionsmaximum bei 578 nm hat. FL3 ist proportional zur Anfärbung mit Peridinin-Chlorophyll (PerCP), welches ein Absorptionsmaximum bei 490 nm und Emissionsmaximum bei 675 nm hat. FL4 ist proportional zur Anfärbung mit Indodicarbocyanin (Cy5), welches ein Absorptionsmaximum bei 650 nm und Emissionsmaximum bei 670 nm hat. Dieser Farbstoff wird mit einem zusätzlichen Laserstrahl angeregt.

3.4.7.2 Oberflächenfärbung

Die gesamte Vorbereitung und Markierung von Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern wurde in FACS-Puffer (PBA) auf Eis durchgeführt. Die Markierung der Zellen wurde in 100 µl PBA durchgeführt. Je nach Anwendung wurden bis maximal 1×10^7 Zellen in ein Polystyrenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Röhrchen mit PBA aufgefüllt

und bei 4°C und 470g für 5min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem Restvolumen von ca. 70µl resuspendiert. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurden die Zellen mit Ratten IgG und antiCD16/CD32 in PBA für 10min inkubiert. Anschließend wurden die Detektionsantikörper in PBA für weitere 10min zugefügt. Die Konzentration der eingesetzten Antikörper wurde zuvor austitriert, betrug aber ca. 1µg pro Färbung. Danach wurden die Zellen mit PBA gewaschen und, wenn nötig, für weitere 10min in 100µl mit einem streptavidinkonjugierten Farbstoff inkubiert und dann gewaschen. Die Zellen wurden dann in 100 bis 300µl PBA aufgenommen, bei Bedarf mit Propidiumiodid versetzt, um die toten Zellen ausschließen zu können, und am FACSCalibur analysiert. Die Auswertung wurde mit dem Programm FCSEXPRESS durchgeführt.

3.4.7.3 Intrazelluläre Färbung muriner Zellen

Vor der intrazellulären Färbung der Zytokine wurden 3×10^6 Zellen aus den inguinalen Lymphknoten und der Milz 6 Stunden mit 10µg/ml rhG6PI in 1ml KM restimuliert. Nach 2 Stunden wurden die Zytokinsekretion durch Zugabe von 5 µg/ml Brefeldin A gestoppt. Neben den mit Antigen stimulierten Zellen wurden als Positivkontrolle auch Zellen mit 5 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Zellsuspension in Polystyrenröhrchen überführt, gewaschen und gegen CD4 gefärbt. Bevor die Zellen intrazellulär angefärbt werden konnten, mussten sie fixiert werden. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBA und anschließend mit PBS gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen wurde und das Pellet resuspendiert wurde, wurden die Zellen in 500µl 2% PFA für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Durch Zugabe von 500µl PBA wurde die Fixierung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBA gewaschen und konnten über Nacht bei 4°C gelagert werden. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem Sekundärfarbstoff SA-PerCP angefärbt und schließlich gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Saponinpuffer gewaschen, der die Zellmembran permeabilisiert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Detektionsantikörpern in Saponinpuffer für 10min markiert und anschließend zweimal mit Saponinpuffer und einmal mit PBA gewaschen. Die Zellen wurden dann in 300µl PBA aufgenommen und am FACSCalibur analysiert.

3.4.7.4 Intrazelluläre Färbung humaner Zellen

1 ml heparinisiertes Blut oder 1×10^6 mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden für 6 Stunden mit 1µg/ml anti-CD28 und zusätzlich mit 1µg/ml des Superantigens SEB als Positivkontrolle, 10µg/ml rhG6PI und 10µg/ml bzw. 44µg/ml der irrelevanten Anti-

gene Hühner-Ovalbumin bzw. rekombinantes Histidin-markiertes OspA (outer surface protein A) der Spirochete *Borrelia burgdorferi* in Polypropylenröhrchen restimuliert. Nach 6h wurde 100µl eiskaltes 2mM EDTA in PBS zu den Zellen gegeben und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten, sofern erforderlich, für 10min mit 9ml FACS™ Lysing Lösung lysiert. Dann wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit 500g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und die Zellen mit 500µl Perm buffer II® für 10min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBA gewaschen und mit den Detektionsantikörpern in PBA gefärbt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Detektionsantikörper an Fc-Rezeptoren wurden die Zellen gleichzeitig auch mit Beriglobin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und wie beschrieben analysiert.

3.4.7.5 Färbung mit CFDA-SE

Um die Proliferation von stimulierten Lymphknotenzellsuspensionen zu verfolgen, wurde der Farbstoff CFDA-SE eingesetzt. CFDA-SE (5-(6) Carboxyfluorescein Diacetat, succinimidyl Ester) ist ein nichtpolarer Farbstoff, der durch die Zellmembran in das Zellinnere eindringt und dort durch zelleigene Esterasen aktiviert wird und grün fluoresziert. Außerdem kann CFDA-SE mit freien Amingruppen reagieren und bleibt dadurch dauerhaft in den Zellen. Nach einer Zellteilung verteilt sich das CFDA-SE zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen, wodurch die Fluoreszenzintensität zur Hälfte abnimmt. 2×10^7 Zellen der inguinalen Lymphknoten wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einem Volumen von 2 ml in PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen 1:1000 mit der 5µM CFDA-SE Lösung versetzt und für genau 4 min bei Raumtemperatur bei dreimaligem Schwenken inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurden 2×10^6 Zellen in 1ml Kulturmedium ausplattiert und mit 10µg/ml rhG6PI oder rmG6PI für drei Tage restimuliert. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das Oberflächenprotein CD4 gefärbt und analysiert.

3.5 Tierversuche

3.5.1 Genotypisierung der Fcγ-Rezeptor defizienten Mäuse

Für die Genotypisierung der Fcγ-RIIB^{-/-} DBA/1 und FcR-γ^{-/-} DBA/1 Mäuse wurde den Mäusen ca. 0,5cm des Schwanzendes abgeschnitten. Aus diesen Schwanzproben wurde die genomische DNS isoliert. Dazu wurden die Proben über Nacht bei 55°C mit 300µl eines Proteinase K haltigen Verdauungspuffers inkubiert. Zu den verdauten Proben wurde 300µl Rotiphenol

gegeben, vorsichtig gemischt und für 5min bei 16.000g zentrifugiert. 150µl der wässrigen Phase wurden abgenommen und die darin enthaltene DNS durch Zugabe von 300µl Ethanol und 90µl Natriumacetat gefällt und für 20min bei 16.000g pelletiert. Anschließend wurde das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 150µl destilliertem Wasser resuspendiert. Mit der gewonnenen DNS wurde folgende PCR durchgeführt:

FcγRIIB^{-/-} PCR	
10x Puffer	2µl
Primer Neo	0,22 µM
Primer 5'EC1	0,22 µM
Primer 3'EC1	0,22 µM
MgCl ₂	4,4 mM
dNTP's	0,2 mM
Taq Polymerase	1 U
DNA	0,5 µl
aqua dest.	ad 20 µl

FcR-γ^{-/-} PCR	
10x Puffer	2µl
Primer Neo	0,22 µM
Primer OL4087	0,22 µM
Primer OL4081	0,22 µM
MgCl ₂	4,4 mM
dNTP's	0,2 mM
Taq Polymerase	1 U
DNA	0,5 µl
aqua dest.	ad 20 µl

PCR-Programm	
94°C	4 min
94°C	30s
60°C	30s
72°C	40s
72°C	10 min
4°C	∞

} 30 Zyklen

Das PCR Produkt wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden unter dem UV-Licht detektiert. Folgende Banden wurden erwartet:

Fcγ-RIIB^{-/-} DBA/1: wt: 161 Bp
-/-: 232 Bp

FcR-γ^{-/-}: wt: 224 Bp
-/-: 302 Bp

3.5.2 Immunisierung

Für die Immunisierung wurde eine Emulsion aus komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) und der Proteinlösung mit rhG6PI, rmG6PI oder kommerziellen Kaninchen G6PI hergestellt. Für die Immunisierung wurde die Proteinlösung mit PBS verdünnt und mit dem gleichen Vo-

lumen CFA in einem 2ml Eppendorfgefäß gemischt. Bei Immunisierung mit denaturierter rhG6PI wurde die Proteinlösung zuvor noch für 5min bei 95°C gekocht und anschließend wieder auf 4°C abgekühlt. Das Gemisch mit zwei Phasen wurde für einige Sekunden mit Ultraschall behandelt, bis eine weiße, feste Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde luftblasenfrei in eine Spritze aufgezogen. Je 100µl der Emulsion wurden links und rechts an der Schwanzbasis subkutan injiziert. Der Ort der Injektion wurde vorher mit 70%igem Ethanol vorsichtig desinfiziert. Die Mäuse wurden mit 200-500µg Protein immunisiert. Zur Kontrolle wurden einige Mäuse auch nur mit PBS in CFA immunisiert. Nach der Immunisierung wurden die Mäuse in den Käfig zurückgesetzt und so lange beobachtet bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen.

3.5.3 Serum- und Blutgewinnung

Zur Serumgewinnung wurde die Schwanzvene der Mäuse punktiert und Blut gewonnen. Dazu wurden die Mäuse für kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt, um eine stärkere Durchblutung der Schwanzvene zu erreichen. Anschließend wurden sie in eine Kiste gesetzt, die die Mäuse in ihren Bewegungen einschränkt. Durch eine kleine Öffnung ragte der Schwanz. Die Schwanzvene wurde in der Nähe der Schwanzbasis vorsichtig mit dem Skalpell punktiert. Der Maus wurden somit zwischen 3-5 Tropfen Blut entnommen. Sollten die Zellen aus dem Blut durchflusszytometrisch untersucht werden, wurde das Blut in MiniCollect® Röhrchen gesammelt, welche eine EDTA-Lösung enthielten und dadurch die Gerinnung des Blutes verhinderten. Anschließend wurde die Punktion vorsichtig mit einem Papiertuch abgewischt und die Maus in den Käfig zurückgesetzt. Sie wurde dort so lange beobachtet, bis die Blutung vollständig zum Stillstand kam. Das Blut wurde für 30 min bei Raumtemperatur zur Gerinnung stehen gelassen und anschließend für 10 min bei 10.000g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C weggefroren.

3.5.4 Intraperitoneale Injektionen

Für die intraperitoneale Injektion wurde die entsprechende Menge an Antikörpern oder dem löslichen dimeren TNF-Rezeptor (sTNFR-p75) in 200µl sterilem PBS verdünnt. Bei der Depletion der CD4⁺ Zellen bzw. der CD4⁺CD25⁺ Zellen wurden 300µg des depletierenden anti-Maus-CD4 Antikörper YTS191.1 bzw. 400µg des anti-Maus-CD25 Antikörpers pC61.5 bei jeder Gabe injiziert. Die Depletion des Komplementproteins C5 wurde mit 750µg des Antikörpers BB5.1 durchgeführt und die Behandlung mit sTNFR-p75 erfolgte mit 100µg. Die Lösungen in PBS wurden blasenfrei in eine Insulinspritze aufgezogen, die schon mit einer dünnen Kanüle versehen war. Die Maus wurde am Nacken und Rücken so gefasst, dass sie in

ihrer Bewegung eingeschränkt war. Anschließend wurden 200µl der Lösung vorsichtig in das Peritoneum injiziert. Nach der Injektion wurden die Mäuse in den Käfig zurückgesetzt und so lange beobachtet bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen. Die Effizienz der Depletion wurde bei der Depletion der CD4⁺ bzw. CD4⁺CD25⁺ Zellen durchflusszytometrisch kontrolliert und bei der Inhibition der Komplementkaskade durch den Komplementaktivitätstest.

3.5.5 Histologie

Für die histologische Untersuchung wurden die Mäuse an den entsprechenden Tagen durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden mit 70%igen Ethanol eingesprüht und anschließend sezziert. Dabei wurden zuerst die inneren Organe, anschließend die Vorder- und Hinterpfoten und zuletzt die Wirbelsäule präpariert. Von den Vorder- und Hinterpfoten wurde zusätzlich das Fell entfernt, da es bei der weiteren Aufarbeitung störte. Alle Organe, Pfoten und die Wirbelsäule wurden in eine 10%ige Formalinlösung überführt und für mindestens eine Woche fixiert. Die gesamte weitere Aufarbeitung wurde von Frau Gabriele Fernahl und Frau Janine Karle in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Veit Krenn am Institut für Pathologie der Charité in Berlin durchgeführt. Dort wurden die Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitte von Dr. Lars Morawietz oder Prof. Dr. Veit Krenn begutachtet und bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle der Glukose-6-phosphat Isomerase als Autoantigen bei Patienten mit RA

4.1.1 CD4⁺ Zellantwort bei Patienten mit rheumatoider Arthritis

Hier soll untersucht werden, ob Patienten mit RA CD4⁺ T-Zellen besitzen, die ein Epitop der G6PI erkennen. Nach Restimulation der CD4⁺ T-Zellen mit G6PI soll die Expression von IFN- γ und TNF- α durchflusszytometrisch bestimmt werden. Blut oder mononukleäre Zellen aus dem peripherem Blut (PBMC) von RA-Patienten oder gesunden Spendern wurden für 6 Stunden in Anwesenheit von anti-CD28, einem Antikörper, der als Agonist auf CD28 wirkt und ein kostimulatorisches Signal liefert, restimuliert. Neben anti-CD28 wurden die Zellen zusätzlich mit rhG6PI, Hühner Ovalbumin (Ova), rekombinantem outer surface protein A (OspA) von *Borrelia burgdorferi* oder dem Superantigen Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) restimuliert. Das OspA Protein ist ein Oberflächenprotein der Spirochete *B. burgdorferi*. SEB ist ein Superantigen, welches die T-Zellen aktivieren kann, die bestimmte V β Domänen exprimieren und hier als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Nach 6 Stunden Restimulation wurde die Expression von TNF- α oder IFN- γ der CD4⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Abb. 4.1 zeigt beispielhaft die Auswertung einer Messung am FACS, die mit dem Blut eines RA-Patienten durchgeführt wurde. Dargestellt sind nur die CD4⁺ Zellen. Alle Proben mit Ausnahme der Proben, die mit SEB restimuliert wurden, zeigten ein ähnliches Bild. Nur sehr wenige CD4⁺ Zellen waren aktiviert und exprimierten TNF- α oder IFN- γ . Die Frequenz der CD69⁺ TNF- α oder IFN- γ produzierender CD4⁺ Zellen schwankte zwischen 0,01% und 0,05% und war unabhängig davon, ob die Zellen neben anti-CD28 mit einem weiteren Antigen stimuliert wurden. Nur nach Restimulation mit OspA waren die Frequenzen mit 0,2% TNF- α und 0,15% IFN- γ produzierender CD4⁺/CD69⁺ Zellen etwas höher. Daneben exprimierten die CD4⁺ Zellen, die zusätzlich mit SEB restimuliert wurden, mit 8,38% TNF- α und 4,01% IFN- γ produzierender CD4⁺/CD69⁺ Zellen große Mengen beider Zytokine. In diesem Patienten konnten keine CD4⁺ T-Zellen identifiziert werden, die mit der Sezernierung von TNF- α und IFN- γ nach Restimulation mit G6PI antworteten. In Abbildung 4.2 ist die Frequenz IFN- γ produzierender CD4⁺CD69⁺ Zellen aller untersuchten Patienten mit RA und gesunden Spendern dargestellt, deren Blut oder PBMC mit den beschriebenen Antigenen restimuliert wurden. Die Zellen von 13 Patienten mit RA und 5 gesunden Spendern wurden

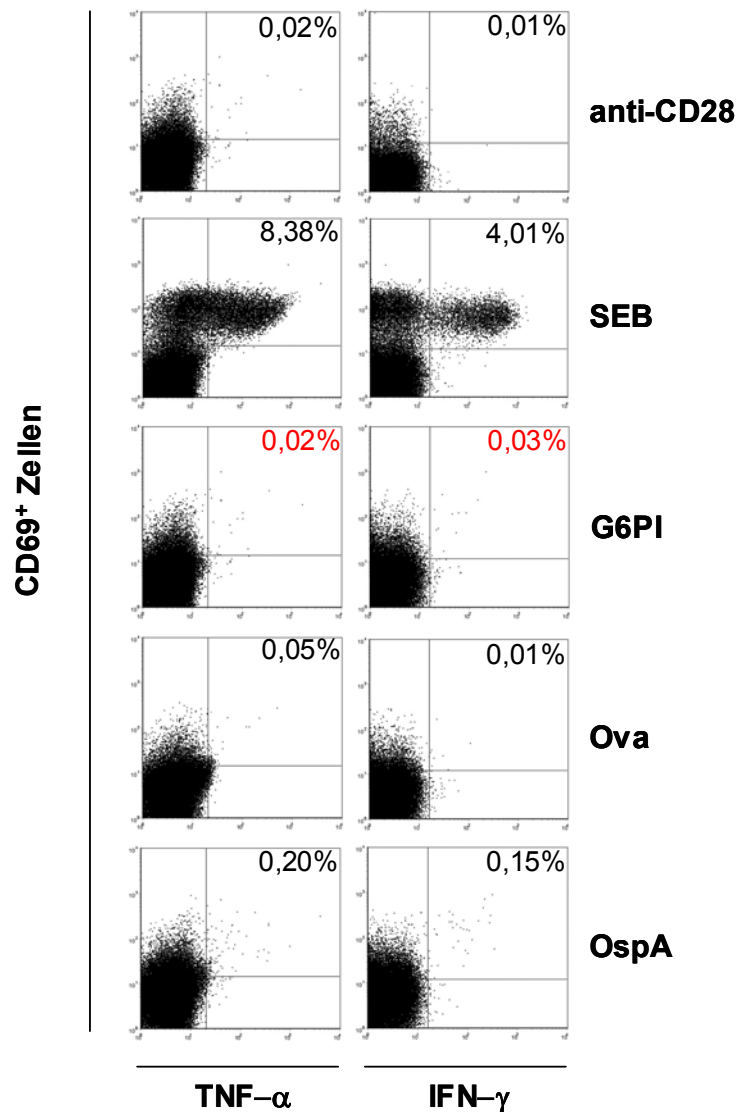


Abb. 4.1: Kein Nachweis G6PI spezifischer T-Helferzellen im Blut von RA-Patienten. Blut eines Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde für 6 Stunden mit anti-CD28 alleine oder zusätzlich mit rhG6PI, dem Superantigen SEB (Staphylokokken Enterotoxin B), dem Ova-Protein (Ovalbumin) oder rekombinanten OspA (outer surface protein A) restimuliert. 2 Stunden nach Beginn der Restimulation wurde die Zytokinsekretion durch Zugabe von Brefeldin A gestoppt. Nach 6 Stunden wurden die Zellen gegen CD4 und CD69 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen TNF- α und IFN- γ gefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt ist eine beispielhafte Messung eines von insgesamt 13 untersuchten Patienten.

ausschließlich mit anti-CD28 restimuliert. Im Mittel produzierten 0,01% der CD4⁺ Zellen der RA-Patienten und 0,06% der CD4⁺ Zellen gesunder Spender IFN- γ . Wurden die Zellen zusätzlich mit rhG6PI restimuliert, exprimierten im Mittel 0,04% der CD4⁺ Zellen der 13 RA-Patienten und 0,18% der CD4⁺ Zellen der 8 gesunden Spender IFN- γ . Obwohl die Frequenz der IFN- γ produzierenden Zellen in den gesunden Spendern höher war, war dieser Unterschied nicht signifikant. Die Analyse mit dem Mann-Whitney Test lieferte ein $P > 0,05$. Die Restimulation mit Ovalbumin zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Ungefähr 0,03% der CD4⁺ Zellen der RA-Patienten und 0,09% der CD4⁺ Zellen der gesunden Spender sezernierten im Mittel IFN- γ . Nach der Restimulation mit OspA exprimierten im Mittel 0,1 % der CD4⁺ Zel-

len der RA-Patienten und sogar 0,5% der $CD4^+$ Zellen der gesunden Spender $IFN-\gamma$. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant, da insgesamt nur die Zellen von 4 gesunden Spendern mit OspA restimuliert wurden. Einer dieser Spender wies eine Frequenz von 1,86% $IFN-\gamma$ produzierender $CD4^+$ Zellen auf.

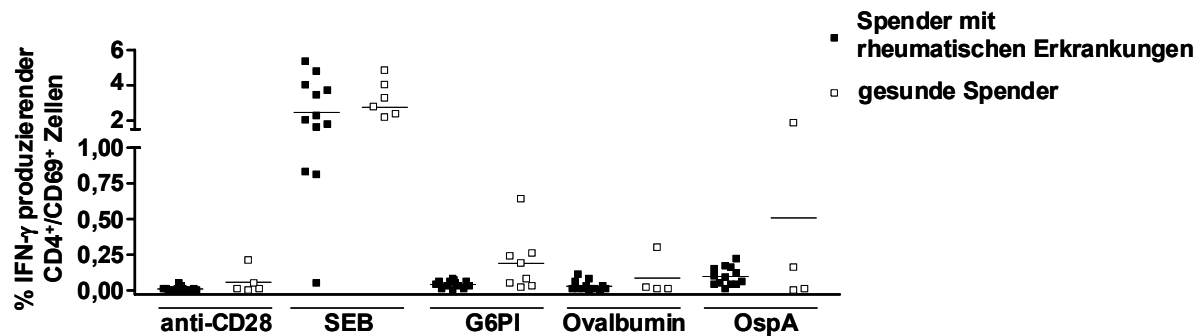


Abb. 4.2: Keine unterschiedliche $IFN-\gamma$ Produktion der T-Helferzellen von RA-Patienten und gesunden Spendern nach Restimulation mit unterschiedlichen Antigenen. Blut oder mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder von gesunden Spendern wurde für 6 Stunden mit anti-CD28 alleine oder zusätzlich mit rhG6PI, dem Superantigen SEB (Staphylokokken Enterotoxin B) oder den irrelevanten Antigenen Ovalbumin (Ova) und dem rekombinanten OspA (outer surface protein A) restimuliert. 2 Stunden nach Beginn der Restimulation wurde die Zytokinsekretion durch Zugabe von Brefeldin A gestoppt. Nach 6 Stunden wurden die Zellen gegen CD4 und CD69 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen $IFN-\gamma$ gefärbt und im FACS analysiert. Jede Messung ist als % $IFN-\gamma$ produzierender $CD4^+CD69^+$ Zellen dargestellt. Zusätzlich sind alle Messungen einer Gruppe auch gemittelt dargestellt.

Alle anderen gesunden Spender oder auch RA-Patienten zeigten keine Frequenzen $IFN-\gamma$ produzierender $CD4^+$ Zellen, die höher als 0,22% waren. Insgesamt waren die gemessenen Frequenzen $IFN-\gamma$ produzierender $CD4^+$ Zellen sehr gering unabhängig davon, ob die Zellen mit anti-CD28 alleine oder zusätzlich noch mit rhG6PI, Ova oder OspA restimuliert wurden. Dass die $CD4^+$ Zellen in der Lage waren, $IFN-\gamma$ zu produzieren, zeigte die Restimulation mit SEB. Die 13 RA-Patienten zeigten im Mittel eine Frequenz von 2,47% und die 8 gesunden Spender von 2,75% $IFN-\gamma$ produzierender $CD4^+$ Zellen nach Restimulation mit SEB. Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch für die Produktion von $TNF-\alpha$ ab. Abb. 4.3 fasst die Ergebnisse zusammen. Hier produzierten im Mittel 5,91% der $CD4^+CD69^+$ Zellen der RA-Patienten und 7,24% der gesunden Spender $TNF-\alpha$ nach Restimulation mit SEB. Die Frequenzen für die Zellen, die mit anti-CD28 alleine oder zusätzlich noch mit den anderen Antigenen restimuliert wurden, lag wieder deutlich niedriger. Die Restimulation mit anti-CD28 lieferte eine mittlere Frequenz von 0,03% für die RA-Patienten und 0,07% für die gesunden Spender. Diese Frequenz erhöhte sich nur geringfügig, wenn die Zellen zusätzlich mit rhG6PI stimuliert wurden. Die mittlere Frequenz von $TNF-\alpha$ produzierenden $CD4^+CD69^+$ Zellen betrug 0,10% bei den RA-Patienten und 0,12% bei den gesunden Spendern.

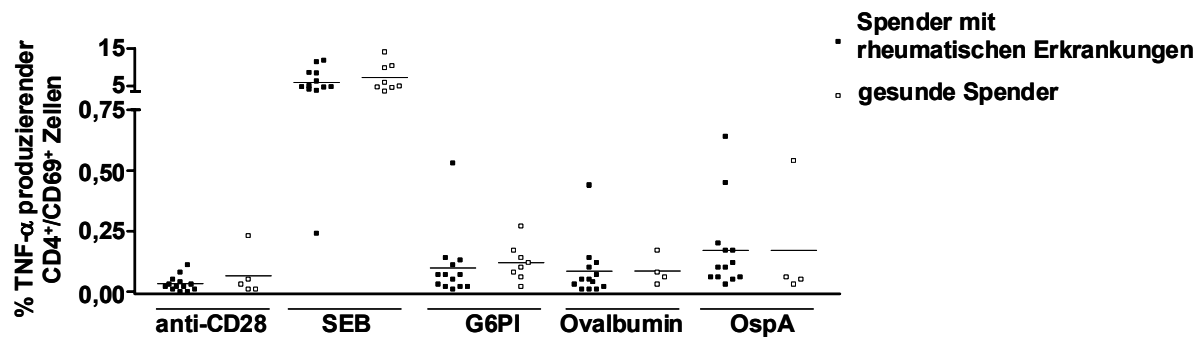


Abb. 4.3: Keine unterschiedliche TNF- α Produktion der T-Helferzellen von RA-Patienten und gesunden Spendern nach Restimulation mit unterschiedlichen Antigenen. Blut oder mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder von gesunden Spendern wurde für 6 Stunden mit anti-CD28 alleine oder zusätzlich mit rhG6PI, dem Superantigen SEB (Staphylokokken Enterotoxin B), dem Ovalbumin (Ova) oder rekombinanten OspA (outer surface protein A) restimuliert. 2 Stunden nach Beginn der Restimulation wurde die Zytokinsekretion durch Zugabe von Brefeldin A gestoppt. Nach 6 Stunden wurden die Zellen gegen CD4 und CD69 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen TNF- α gefärbt und im FACS analysiert. Jede Messung ist als % TNF- α produzierender CD4⁺CD69⁺ Zellen dargestellt. Zusätzlich sind alle Messungen einer Gruppe auch gemittelt dargestellt.

Dieser Unterschied war erneut nicht signifikant ($P > 0,15$). Auch die Restimulation mit OspA lieferte im Mittel Frequenzen von unter 0,18% TNF- α produzierender CD4⁺CD69⁺ Zellen bei den RA-Patienten und unter 0,11% bei den gesunden Spendern nach Restimulation mit Ovalbumin. Es konnte kein Unterschied in der Frequenz autoreaktiver G6PI-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Blut von Patienten mit RA oder gesunden Spendern festgestellt werden. Insgesamt ließen sich nur sehr wenige CD4⁺ T-Zellen überhaupt mit rhG6PI restimulieren.

4.1.2 Die humorale Immunantwort gegen humane und Kaninchen Glukose-6-phosphat Isomerase bei RA-Patienten

Serum von 61 RA-Patienten, sowie von 21 Patienten, mit anderen rheumatischen Erkrankungen, wie z.B. ankylosierende Spondylitis, Kollagenose, Vaskulitis und Psoriasis Arthritis, und 32 gesunden Spendern wurden im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern untersucht. Zum Nachweis der anti-G6PI Antikörper wurde rhG6PI und kommerziell erhältliche Kaninchen G6PI verwendet, die aus dem Muskel von Kaninchen aufgereinigt wurde. Die Kaninchen G6PI Präparation wurde verwendet, da angeblich 64% der RA-Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen Kaninchen G6PI entwickelten (Schaller et al. (2001)).

Im linken Teil der Abb. 4.4 sind die Ergebnisse für den ELISA gegen die humane G6PI Präparation dargestellt. Unter den 32 gesunden Spendern wiesen 2 Spender (6,25%) einen erhöhten Antikörpertiter gegen rhG6PI auf. Keiner der 21 Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen entwickelte erhöhte Antikörpertiter gegen rhG6PI. Auch bei den RA-Patienten entwickelten nur 2 von 61 Patienten (3%) erhöhte Antikörpertiter. Dieses Ergebnis wider-

spricht der oben erwähnten Studie, wo 64% der RA-Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen Kaninchen G6PI entwickelten.

Die eben beschriebenen Experimente wurden mit einer kommerziell erhältlichen Kaninchen G6PI Präparation wiederholt. Die Ergebnisse sind im rechten Teil der Abb. 4.4 dargestellt. Nur ein Serum der gesunden Spender enthielt einen erhöhten Antikörpertiter gegen G6PI. 9 der 21 Seren der Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen (42%) zeigten erhöhte Antikörperkonzentrationen, die gegen G6PI gerichtet waren. Auch in den RA-Patienten entwickelten 15 der 61 (25%) Patienten eine erhöhte Konzentration von Antikörpern gegen G6PI. Diese Ergebnisse zeigen, dass abhängig von der Präparation unterschiedliche Titer bestimmt werden konnten.

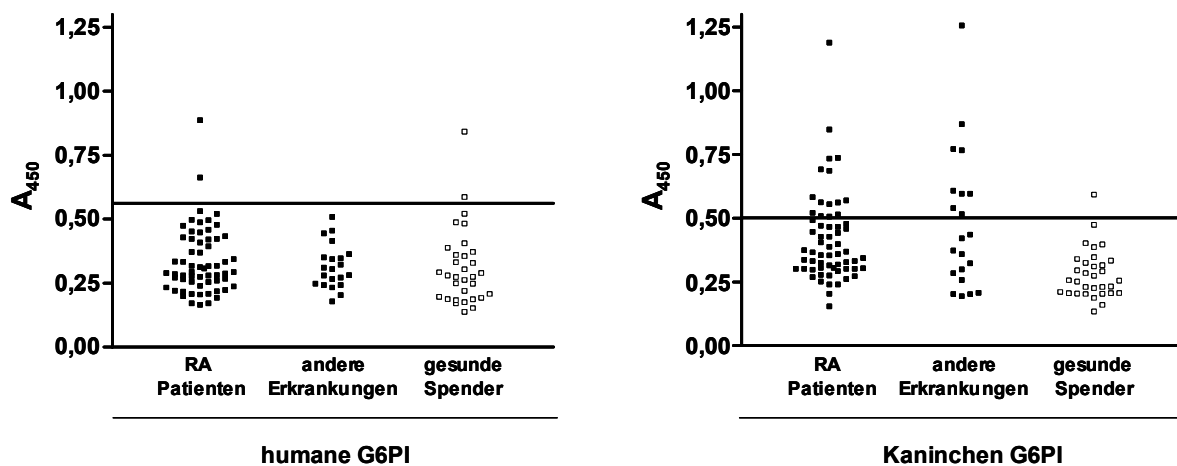


Abb. 4.4: Einige RA-Patienten entwickeln Antikörper gegen eine kommerzielle Kaninchen G6PI Präparation nicht aber gegen rekombinante humane G6PI. Serum von 61 Patienten mit RA, 21 Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen (Vaskulitis, ankylosierende Spondylitis, Kollagenosen und Psoriasis Arthritis), sowie Serum von 32 gesunden Spendern wurde im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern untersucht. Dabei wurden die Seren 1:50 verdünnt und gegen die rekombinante humane G6PI Präparation (linke Abbildung) oder gegen die kommerziell erhältliche G6PI Präparation aus Kaninchenmuskel (rechte Abbildung) getestet. Ein Serum wurde als positiv auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern bewertet, wenn die Absorption bei 450nm größer war als die mittlere Absorption der gesunden Spender plus zwei Standardabweichungen. Die durchgezogene Linie markiert diese Absorption.

4.1.3 Immunoblot- und MALDI-Analyse eines potentiellen Autoantigens bei rheumatoider Arthritis

Der vorige Abschnitt zeigte, dass Patienten mit RA oder anderen rheumatischen Erkrankungen keine erhöhten Antikörpertiter gegen rekombinante humane G6PI im Vergleich zu den gesunden Spendern entwickelten. Im Gegensatz dazu enthielten 25 bzw. 42% der Seren von Patienten mit RA und anderen rheumatischen Erkrankungen erhöhte anti-G6PI-IgG Konzentrationen bei Verwendung der Kaninchen G6PI Präparation. Um diesen Widerspruch aufzuklä-

ren, wurden beide Präparationen in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blau angefärbt.

Abb. 4.5 zeigt, dass nach Auftrennung der rhG6PI Präparation im SDS-Polyacrylamidgel ausschließlich eine große Bande bei ungefähr 55 kDa sichtbar wurde. 55 kDa ist die vorhergesagte Größe von G6PI. Die Präparation des kommerziellen Kaninchen G6PI zeigte bei 55kDa auch eine große Bande. Zusätzlich zu dieser Bande wurden kontaminierende Banden bei 85kDa, 60kDa, 40kDa, 35kDa und 33kDa sichtbar. Das Serum der Patienten, die im ELISA gegen die kommerzielle Präparation der Kaninchen G6PI positiv auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörper getestet wurden, wurden auch im Immunoblot untersucht.

In Abbildung 4.5 ist beispielhaft ein Immunoblot mit dem Serum eines Patienten mit Vaskulitis dargestellt.

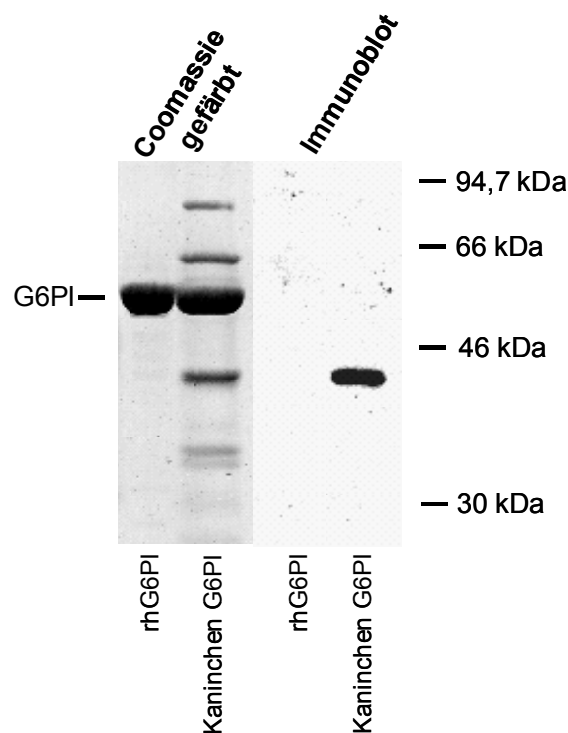


Abb. 4.5: SDS-PAGE der G6PI Präparationen und Immunoblot Analyse eines Patienten Serums. Die Präparationen der rekombinanten humanen G6PI und der kommerziell erhältlichen Kaninchen G6PI wurden in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blau angefärbt. Zusätzlich wurden beide Präparationen auf Nitrocellulose transferiert. Das Serum einiger Patienten, die im ELISA erhöhte Antikörpertiter gegen das Kaninchen G6PI aufwiesen, wurden im Immunoblot auf die Spezifität ihrer Antikörper gegen G6PI getestet. Die Bindung von Antikörpern an eines der aufgetrennten Proteine beider Präparationen wurde mit einem Peroxidase-konjugiertem anti-human IgG Sekundärantikörper detektiert. Ein Beispiel ist gezeigt.

Nach der Entwicklung des Immunoblots konnte die Bindung von IgG-Antikörpern an ein Protein der Kaninchen G6PI-Präparation beobachtet werden, welches ein Molekulargewicht von ca. 40kDa besaß. Keine Bindung von Antikörpern konnte dagegen an die G6PI beider Präparationen beobachtet werden.

Um das Protein der kommerziell erhältlichen G6PI Präparation zu identifizieren, wurde die entsprechende Bande bei 40kDa ausgeschnitten. Das Protein wurde mit Trypsin verdaut. Anschließend wurde ein peptide mass fingerprint (PMF) mittels einer MALDI-MS (matrix assisted laser desorption – ionization mass spectrometry) Messung erstellt.

In Abbildung 4.6 ist das aufgezeichnete Massenspektrum dargestellt. Insgesamt wurden in diesem Massenspektrum 24 unterschiedliche Peptide nachgewiesen. Zwei dieser Peptide lieferten nur sehr geringe Signale und wurden für die anschließende Datenbanksuche nicht berücksichtigt. Das Protein wurde mit Hilfe der Massen der detektierten Peptide über das Programm Ms-Fit (<http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/~ucshtml3.2/msfit.htm>) bestimmt. Bei diesem Protein handelte es sich um die M-Kette der Kaninchen Kreatinkinase (CK-M).

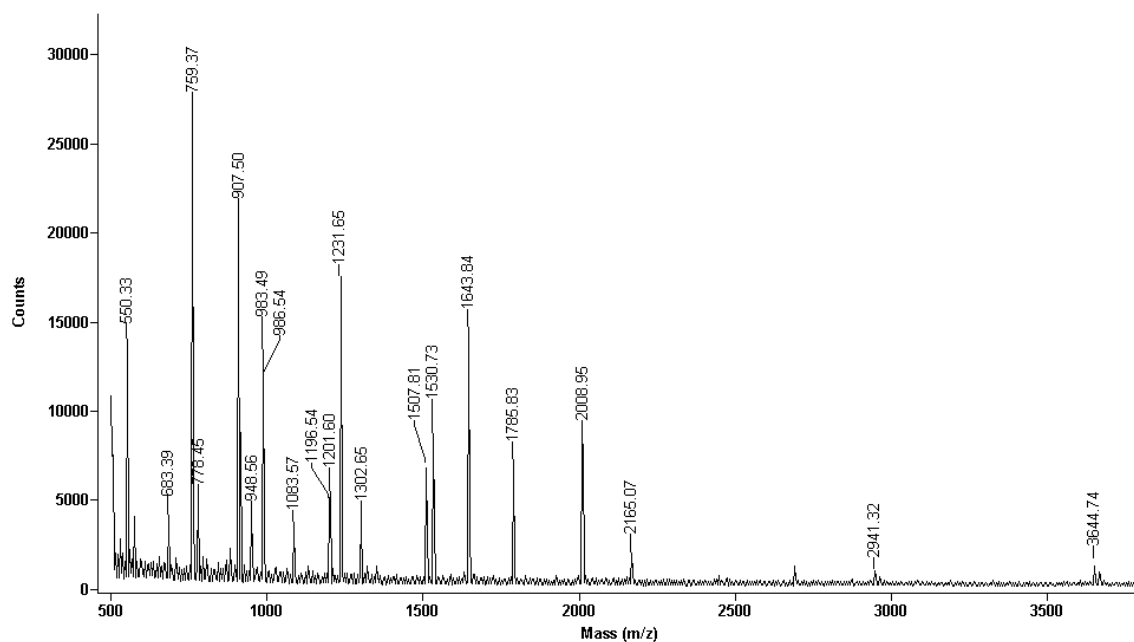


Abb. 4.6: Massenspektrum eines potentiellen Autoantigens bei RA. Nach Auftrennung der Kaninchen G6PI Präparation mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde eine Bande bei ca. 40kDa ausgeschnitten. Dieses Protein wurde zuvor im Immunoblot von IgG-Antikörpern aus dem Serum einiger Patienten mit RA und anderen rheumatischen Erkrankungen spezifisch gebunden. Das Protein wurde mit Trypsin verdaut und einem peptide mass fingerprint (PMF) mittels einer MALDI-MS (matrix assisted laser desorption – ionization mass spectrometry) Messung unterzogen. Die dargestellten Signale stellen die detektierten Peptide dar. Die Zahlen an der Spitze der Signale geben die Masse der detektierten Peptide in Da an. Es wurden keine Peptide berücksichtigt, die kleiner als 500 Da waren. Insgesamt wurden 21 der 24 gemessenen Peptide für die Analyse des PMF herangezogen. Die MALDI-MS Analyse wurde von Peter Jungblut und Monika Schmidt am MPI für Infektionsbiologie durchgeführt.

In Tab. 4.1 wurden die Massen der detektierten Peptide und deren Abschnitte in der Sequenz der M-Kette der Kaninchen Kreatinkinase dargestellt. Die detektierten Peptide im Massen-

spektrum deckten 64% dieser Sequenz ab. Bei zwei der 22 Peptide konnten Modifikationen an den Cysteinen festgestellt werden. Es handelte sich dabei um ein Peptid, welches die Aminosäuren 139-148 der M-Kette der Kaninchen Kreatinkinase umfasste, sowie dem Peptid, welches die Aminosäuren 267-292 umfasste.

m/z	Start	Ende	Peptid Sequenz	Modifikationen
550.33	248	251	(K)EVFR(R)	
683.39	173	177	(K)YYPLK(S)	
759.37	210	215	(R)DWPDAR(G)	
778.45	260	265	(K)IEEIFK(K)	
907.50	308	314	(K)FEEILTR(L)	
948.56	33	40	(K)VLTPDLYK(K)	
983.49	216	223	(R)GIWHNDNK(S)	
986.54	97	105	(R)HGGFKPTDK(H)	
1083.57	108	116	(K)TDLNHENLK(G)	
1196.54	16	25	(K)SEEEYPDLSK(H)	
1201.60	139	148	(K)GYTLPPHCSR(G)	1Cys-am
1231.65	87	96	(K)DLFDPIIQDR(H)	
1302.65	370	381	(K)GQSIDDMIPAQK(-)	
1507.81	157	170	(K)LSVEALNSLTGEFK(G)	
1530.73	117	130	(K)GGDDLDPHYVLSSR(V)	
1643.84	224	236	(K)SFLVWVNEEDHLR(V)	
1785.83	117	132	(K)GGDDLDPHYVLSSRV(R)	
1785.83	342	358	(R)LGSSEVEQVQLVVDGVK(L)	
2008.95	321	341	(R)GTGGVDTAAVGSVFDISNADR(L)	
2165.07	320	341	(K)RGTGGVDTAAVGSVFDISNADR(L)	
2941.32	267	292	(K)AGHPFMWNEHLGYVLTCPNLTGLR(G)	1Cys-am
3644.74	178	209	(K)SMTEQEQQLIDHFLFDKPVSPLLASGMAR(D)	

Tab. 4.1: Liste der detektierten Peptide der M-Kette der Kreatinkinase nach MALDI-MS und Datenbankanalyse durch MS-Fit. Die nach Trypsinverdau und MALDI-MS gemessenen Massen der detektierten Peptide im Massenspektrum wurden einer Datenbanksuche mit dem Programm MS-Fit (<http://falcon.ludwig.ucl.ac.uk/ucsfhtml3.2/msfit.htm>) unterzogen. Die Analyse identifizierte das Protein als die M-Kette der Kaninchen Kreatinkinase. Dargestellt wurden die Massen der einzelnen Peptide in Da (m/z), sowie der Bereich und die Sequenz der Kreatinkinase, die das entsprechende Peptid abdeckt. Außerdem wurden Modifikationen an den entsprechenden Peptiden dargestellt. Insgesamt deckten die detektierten Peptide 64% der Sequenz der M-Kette der Kaninchen Kreatinkinase ab.

4.1.4 Die humorale Immunantwort gegen die M-Kette der Kreatinkinase bei RA-Patienten

Nun sollte untersucht werden, ob die Seren der RA-Patienten, Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen oder der gesunden Spender erhöhte anti-CK-M Konzentrationen auf-

wiesen. Die M-Kette der Kaninchen Kreatinkinase wurde an ELISA Platten gebunden und erneut mit den unterschiedlichen Seren inkubiert.

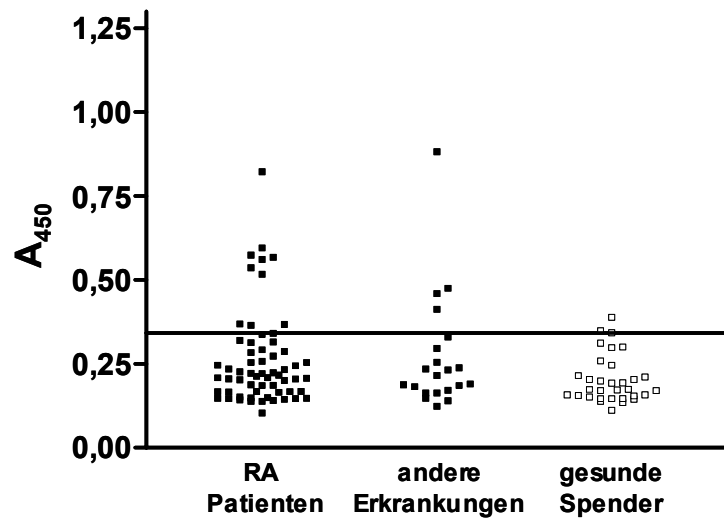


Abb. 4.7: Detektion von Autoantikörpern gegen die M-Kette der Kreatinkinase. Serum von 61 Patienten mit RA, 21 Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen sowie Serum von 32 gesunden Spendern wurde 1:50 verdünnt und im ELISA auf die Anwesenheit von anti-Kreatinkinase M-Kette Antikörpern untersucht. Ein Serum wurde als positiv auf die Anwesenheit von anti-CK-M Antikörpern bewertet, wenn die Absorption bei 450nm größer war als die mittlere Absorption der gesunden Spender plus zwei Standardabweichungen. Die durchgezogene Linie markiert diese Absorption.

In Abb. 4.7 werden die Ergebnisse dargestellt. Ein gesunder Spender zeigte eine erhöhte Konzentration von Antikörpern gegen die M-Kette der Kreatinkinase im Serum. In 4 von 21 Patienten mit Erkrankungen, die zum rheumatischen Formenkreis gehören, und 10 von 61 RA-Patienten wurden erhöhte Konzentration von anti-Kreatinkinase Antikörpern gemessen. Unter diesen 10 RA-Patienten waren auch 4 Patienten deren Antikörper zuvor auch die Kaninchen G6PI Präparation erkannt hatten. Damit konnte gezeigt werden, dass einige Patienten mit RA aber auch mit anderen rheumatischen Erkrankungen Antikörper gegen die M-Kette der Kreatinkinase ausbildeten. Die gegen G6PI gerichteten Antikörper aus der Kaninchen Präparation waren tatsächlich gegen Kontaminanten in dieser Präparation gerichtet.

4.2 Die Induktion und Beschreibung einer Arthritis mit Glukose-6-phosphat Isomerase in der Maus

4.2.1 Arthritisinduktion in der Maus durch Immunisierung mit humaner Glukose-6-phosphate Isomerase

Für den Versuch einer Arthritisinduktion mit Glukose-6-phosphat Isomerase wurden unterschiedliche Mausstämme ausgewählt. Der DBA/1 Stamm und der B10.Q Stamm sind suszeptibel für die Kollagen induzierte Arthritis (CIA) und exprimieren beide den MHC-Haplotyp H2-q. Der Stamm B10.A exprimiert H2-k und ist sonst dem B10.Q Stamm sehr ähnlich. Daneben wurde der Stamm SWR gewählt, der auch H2-q exprimiert. Der DBA/2 Stamm ähnelt dem DBA/1 Stamm genetisch am stärksten, exprimiert jedoch H2-d. Außerdem wurde der AKR Stamm ausgewählt, der nach einer Infektion mit *B. burgdorferi* eine Arthritis entwickelt.

Stamm	MHC-Haplotyp	Inzidenz
BALB/c	H2-d	0/8
C57BL/6	H2-b	0/8
DBA/2	H2-d	0/11
AKR	H2-k	0/8
B10.A	H2-k	0/8
DBA/1x C57BL/6	H2-q/b	0/5
SWR	H2-q	0/10
B10.Q	H2-q	0/8
DR4mix	HLA-DR0401	0/8
DR4-Kim	HLA-DR0401	1/11
DBA/1	H2-q	311/327

Tab. 4.2: Arthritisinduktion durch Immunisierung mit rhG6PI. Mäuse unterschiedlicher Stämme wurden mit rekombinanter humaner G6PI in komplettem Freundschens Adjuvans an der Schwanzbasis immunisiert und über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen auf klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet.

Zusätzlich wurden die Stämme BALB/c und C57/BL6 ausgewählt, die standardmäßig bei vielen Fragestellungen im Labor benutzt werden. Neben den reinen Wildtypinzuchtstämmen wurden auch HLA-DR4 transgene Tiere ausgewählt. Dazu zählte ein DR4 transgener Stamm auf einem Mischhintergrund (DR4mix) und ein Stamm auf DBA/1 Hintergrund, der eine Chimäre aus dem endogenen Maus MHC-II und aus dem humanen HLA-DR0401 exprimiert (DR4-Kim). Außerdem wurde versucht, in der F₁ Generation einer Kreuzung von DBA/1 Mäusen und C57/BL6 Mäusen, eine Arthritis zu induzieren. Die Mäuse wurden mit rekombinanten humanen G6PI in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA) subkutan an der

Schwanzbasis immunisiert und über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen auf klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet (Tab. 4.2). Zur Kontrolle wurden diese Mäuse auch ausschließlich mit CFA immunisiert (Daten nicht gezeigt). Über 95% der DBA/1 Tiere und eine Maus des DR4-Kim Stammes entwickelten eine Arthritis nach G6PI Immunisierung nicht aber nach Immunisierung nur mit CFA.

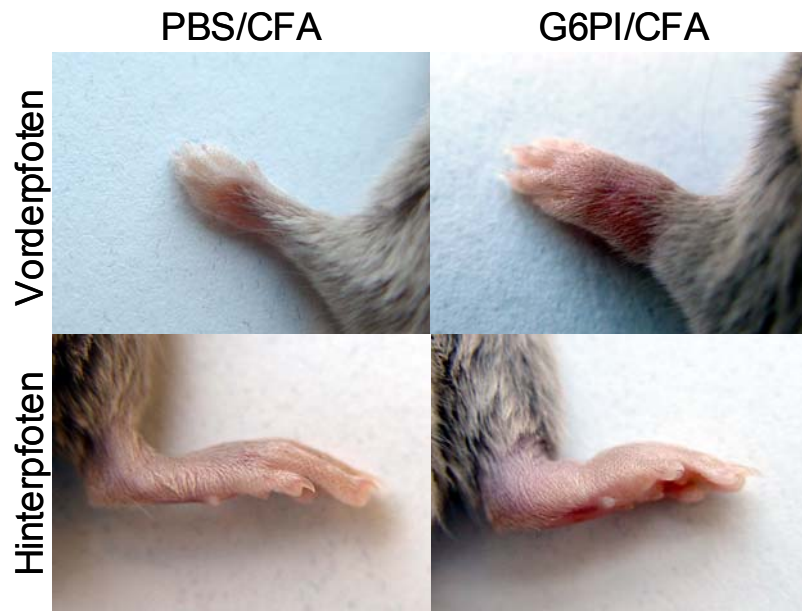


Abb. 4.8: Arthritisinduktion bei DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden mit rekombinanter humaner G6PI in CFA oder mit PBS/CFA subkutan an der Schwanzbasis immunisiert. PBS/CFA immunisierte Mäuse zeigten 15 Tage nach Immunisierung keine klinischen Anzeichen einer Arthritis in den Vorder- (links oben) und Hinterpfoten (links unten). Im Gegensatz dazu entwickelten DBA/1 Mäuse nach subkutaner Immunisierung mit rhG6PI/CFA eine schwere symmetrische Arthritis in den Vorder- (rechts oben) und Hinterpfoten (rechts unten).

Das Allgemeinbefinden der klinisch unauffälligen Mäuse schien normal. Die Tiere zeigten die gleiche Aktivität bezüglich Bewegung und Nahrungsaufnahme wie Tiere ihres Stammes, die nicht immunisiert wurden, bzw. die ausschließlich mit CFA immunisiert wurden. Das Fell dieser Mäuse war glatt anliegend und glänzend. DBA/1 Mäuse, die mit G6PI immunisiert wurden, zeigten eine massive Schwellung der Vorder- und Hinterläufe (Abb. 4.8). Bei den kranken Tieren war der Bewegungsdrang deutlich eingeschränkt. Einige Tiere verloren nach ein paar Tagen deutlich an Gewicht (Daten nicht gezeigt). Das Fell dieser Tiere wirkte im Vergleich zu nicht-immunisierten Tieren stumpf und struppig, was ein deutlicher Hinweis auf ein schlechtes Allgemeinbefinden der Tiere war. DBA/1 Mäuse, die nur mit CFA immunisiert wurden, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Tagen keine klinischen Anzeichen einer Arthritis.

4.2.2 Klinischer Verlauf nach Arthritisinduktion mit humaner Glukose-6-phosphat Isomerase

Nach Immunisierung mit rhG6PI entwickelten über 95% der DBA/1 Mäuse eine periphere symmetrische Arthritis in den Vorder- und Hinterpfoten. Die Tiere wurden nach Immunisierung über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet und bezüglich klinischer Anzeichen einer Arthritis bewertet. Dabei wurde jede Pfote einer Maus einzeln bewertet und die klinischen Zeichen der Arthritis in drei Schweregrade unterteilt. Der Grad 0 entsprach einer gesunden, klinisch unauffälligen Pfote. Bei einem Grad 1 zeigten die Pfoten eine leichte Schwellung und eine leichte Rötung. Der Grad 2 war der Maximalbefund. Die Pfoten waren stark angeschwollen und massiv gerötet. Eine Maus konnte einen maximalen Arthritisgrad von 8 erreichen.

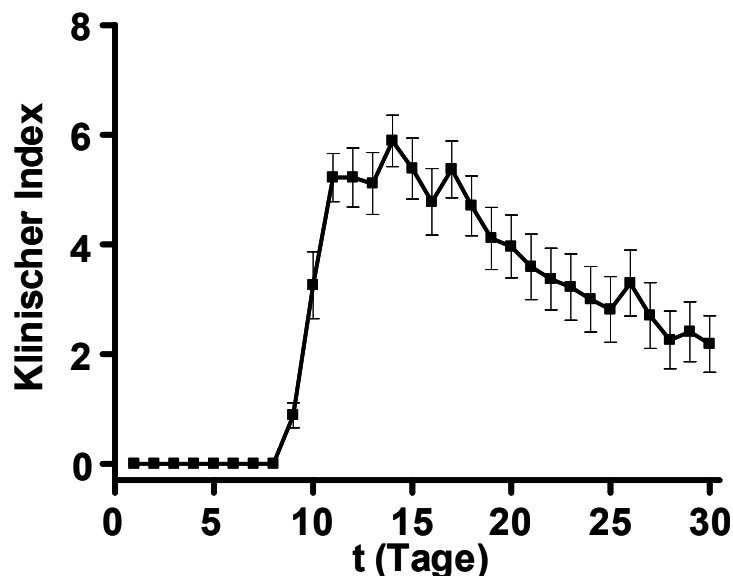


Abb. 4.9: Klinischer Verlauf der G6PI induzierten Arthritis. 27 DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert und auf die Entwicklung einer Arthritis in den Vorder- und Hinterpfoten beobachtet. Jede Pfote einer Maus wurde einzeln bewertet. Dabei wurde die Arthritis in drei Grade unterteilt. Grad 0: klinisch unauffällig, Grad 1: leichte Schwellung und Rötung, Grad 2: Maximalbefund – massive Schwellung und Rötung. Die Bewertung der 27 Tiere zu jedem Zeitpunkt wurde gemittelt und als Mittel mit SEM dargestellt.

Die Abb. 4.9 zeigt den klinischen Verlauf von 27 DBA/1 Tieren, die mit rhG6PI immunisiert wurden und eine Arthritis entwickelten. Nach Immunisierung mit rhG6PI zeigten die DBA/1 Mäuse bis zum Tag 8 keine klinischen Anzeichen einer Arthritis. Die Entwicklung der Arthritis begann exakt 9 Tage nach Immunisierung, wobei erste leichte Schwellungen zu beobachten waren. Zwischen dem 12. und 14. Tag nach Immunisierung zeigten alle Tiere eine Schwellung der Vorder- und Hinterpfoten, die sich im Verlauf des Beobachtungszeitraumes nicht mehr verschlimmern sollte. Dabei wurde an Tag 14 ein mittlerer Arthritisgrad von $5,9 \pm 0,5$ (Mittelwert \pm Standardfehler) erreicht. Bis Tag 17 zeigten die Tiere im Mittel einen

schweren Verlauf der Arthritis mit Arthritisgraden, die, bis auf Tag 16, bei ≥ 5 lag. Ab Tag 18 verlief die Arthritis zunehmend milder und die Schwellung der Pfoten nahm langsam aber kontinuierlich ab. An Tag 20 wurde nur noch ein Arthritisgrad von $3,9 \pm 0,6$ gemessen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag 30 lag der mittlere Arthritisgrad bei $2,2 \pm 0,5$. Tiere, die über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden, z.B. über 60 Tage, zeigten nach 60 Tagen keine klinischen Anzeichen einer akuten Schwellung mehr.

4.2.3 Histologischer Verlauf nach Arthritisinduktion mit humaner Glukose-6-phosphat Isomerase

Neben dem klinischen Verlauf wurde die Entwicklung und der Verlauf der Arthritis in den DBA/1 Mäusen auch histologisch verfolgt. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung mit rhG6PI DBA/1 Mäuse histologisch untersucht und das Ausmaß der Entzündung bestimmt. Zu diesem Zweck wurde, angelehnt an ein Skalierungssystem im Menschen, ein System etabliert, um einheitlich das Maß der Entzündung zu bestimmen Krenn et al. (2002). Die Abb. 4.10 zeigt die Einteilung für die Maus. Fünf unterschiedliche Kriterien wurden bei der Bewertung der Entzündung des Gelenkes berücksichtigt. Dazu zählten das Ausmaß der Synovitis, der Tenosynovitis, Periostitis, Periarthritis und das Ausmaß der Knorpel- und Knochendestruktion, hier nur mit Destruktion bezeichnet. Jedes dieser Kriterien wurde in vier Schweregrade unterteilt, welche am Beispiel der Synovitis erläutert werden. Der Grad 0 entspricht dabei dem Normalbefund einer gesunden Maus. Der Grad 1 ist durch eine geringfügige Stromaaktivierung, einer leichten Verbreiterung der Deckzellschicht und durch die Infiltration einiger inflammatorischer Zellen gekennzeichnet. Eine mäßiggradige Infiltration von Zellen und Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht entspricht einer Synovitis des Grades 2. Das Vollbild eines destruierenden Pannus kennzeichnet den Grad 3 einer Synovitis. Um den Arthritisgrad einer Pfote bestimmen zu können, wurden die Werte jedes Kriteriums addiert und bildeten den Gesamtgrad einer Pfote. Der maximale Grad, der erreicht werden konnte, lag bei 15. In den vorderen Läufen entwickelten die Tiere hauptsächlich im Handgelenk, den metacarpalen Gelenken, sowie in den proximalen und distalen interphalangealen Gelenken eine Arthritis. In den hinteren Läufen waren vor allem die tarsalen, Knöchel- und Kniegelenke betroffen. Abb. 4.11 zeigt den histologischen Verlauf der Arthritis nach Immunisierung mit rhG6PI. Pro Zeitpunkt wurden 3 Tiere für die histologische Bewertung verwendet. Der Arthritisgrad jeder Pfote wurde addiert und bildete den histologischen Arthritisgrad der Maus. Der maximale Grad, der erreicht werden konnte, lag bei 60, da jede Pfote

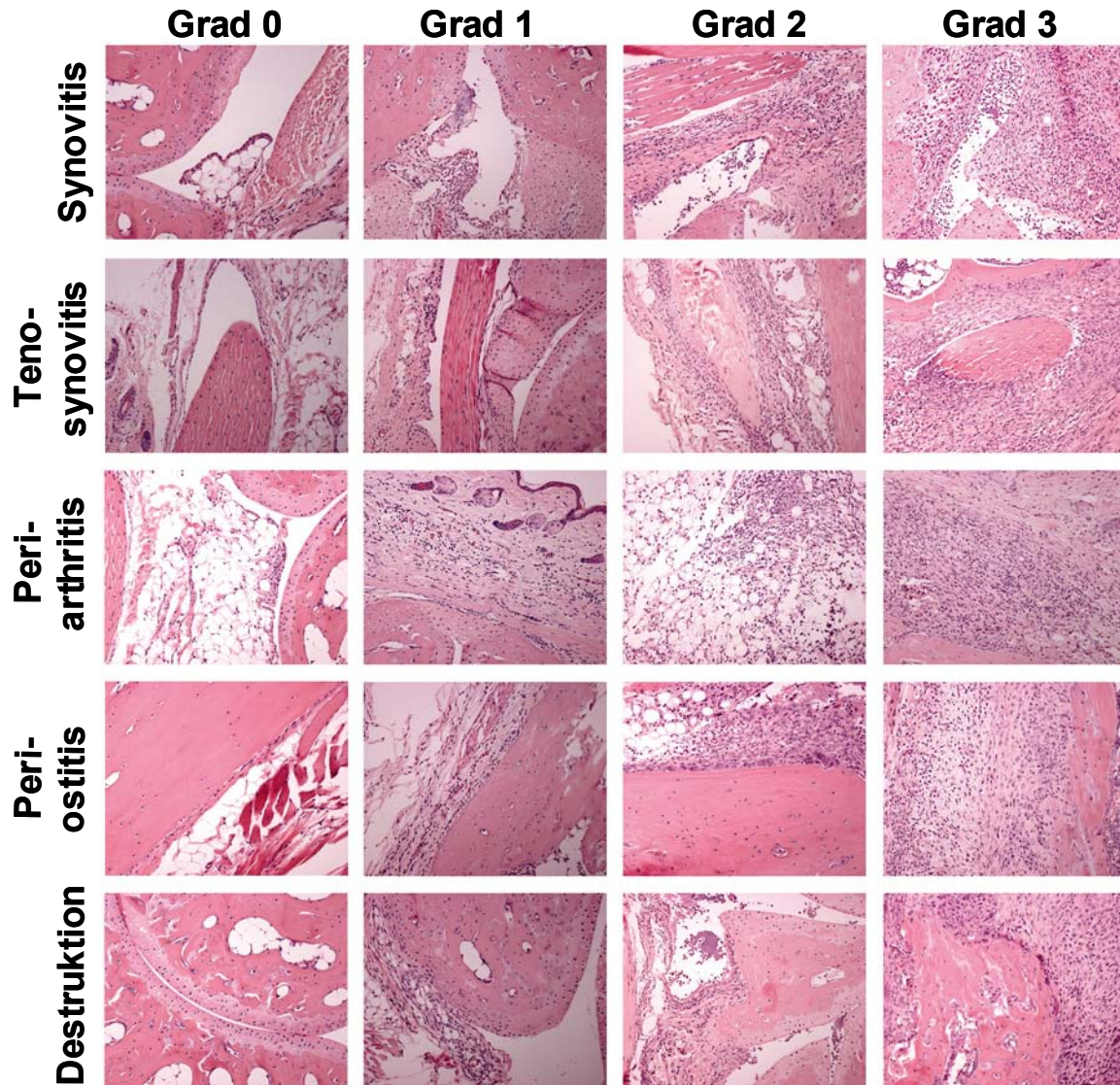


Abb. 4.10: Histologische Arthritisbewertung. HE-Färbungen (100fache Vergrößerung) von Gelenkschnitten der hinteren Pfoten von DBA/1 Mäusen, die mit rhG6PI immunisiert wurden und eine Arthritis entwickelten, bzw. gesunden mit PBS/CFA immunisierten DBA/1 Mäusen. Bei der Bewertung der Entzündung in den Gelenken der Mäuse wurden fünf Kriterien berücksichtigt: Synovitis, Tenosynovitis, Periostitis, Periarthritis und das Maß der Destruktion des Knorpels und des Knochens des betroffenen Gelenks. Jedes Kriterium wurde in vier unterschiedliche Schweregrade eingeteilt. Der Grad 0 entsprach dem Normalbefund bei einer gesunden Maus. Die Grade 1-3 entsprachen leichten, mittleren und schweren Befunden eines jeden Kriteriums. Die Punkte aller Kriterien wurden addiert und bildeten den Arthritisgrad des untersuchten Gelenks. 15 war somit der maximale Arthritisgrad, der bei einem Gelenk erreicht werden konnte.

wie oben beschrieben einen Grad von 15 erreichen konnte. Die Ergebnisse aller drei Mäuse pro Zeitpunkt wurden gemittelt. An den Tagen 3 und 6 konnten noch keine Infiltrationen von Zellen in den peripheren Gelenken beobachtet werden. An Tag 3 gab es ein Tier, welches in der hinteren rechten Pfote eine leichte Synovitis und Tenosynovitis des Grades 1 aufwies. Ansonsten wiesen alle Tiere an den Tagen 3 und 6 Normalbefunde auf. Erste histologische Veränderungen konnten an Tag 9 beobachtet werden. Der mittlere Arthritisgrad betrug zu diesem Zeitpunkt $13,7 \pm 6,8$. Dieser mittlere Arthritisgrad setzte sich vor allem aus einer

leichten bis mittleren Synovitis, Tenosynovitis und Periarthritis zusammen. Knorpel- und Knochendestruktion sowie Perostitis lagen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor.

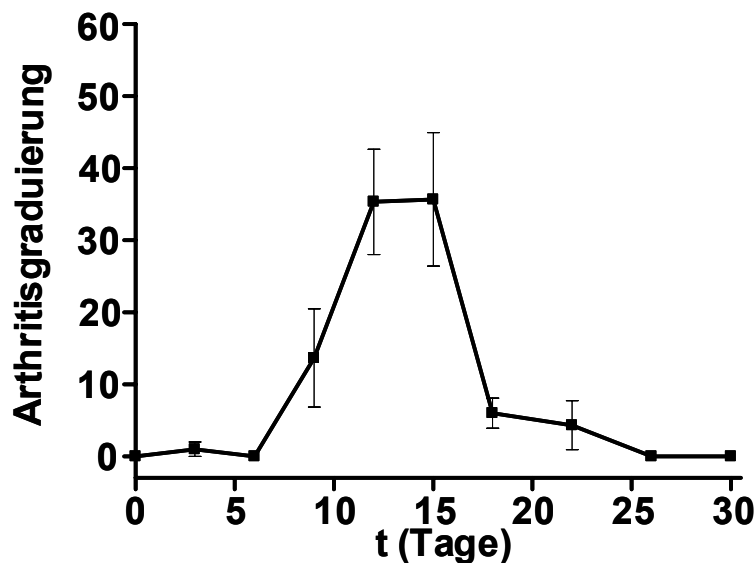


Abb. 4.11: Histologischer Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis in DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden 3 Mäuse histologisch nach oben eingeführtem Arthritis-skalaierungssystem bewertet. Dabei wurde jede Pfote einzeln bewertet und die Ergebnisse addiert. Die Ergebnisse der einzelnen Mäuse pro Zeitpunkt wurden gemittelt und sind als Mittel mit SEM dargestellt.

Die Mäuse, die an den Tagen 12 und 15 untersucht wurden, hatten einen ähnlichen Befund. Bei einem mittleren Arthritisgrad von $35,3 \pm 6,8$ an Tag 12 bzw. $35,6 \pm 9,2$ an Tag 15 lagen vor allem mittlere und schwere Synovitis, Tenosynovitis und Periarthritis vor. Dagegen konnte nur eine leichte bis mittlere Knorpel- und Knochendestruktion und vereinzelt leichte Perostitis festgestellt werden.

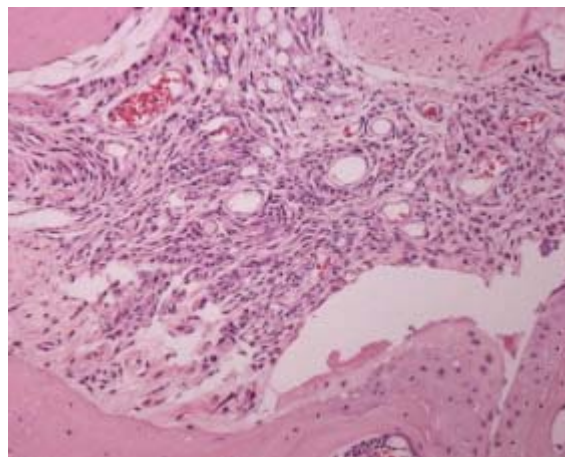


Abb. 4.12: Reparaturprozesse nach Arthritisinduktion mit rhG6PI. HE-Färbung (100fache Vergrößerung) eines Gelenkschnittes einer DBA/1 Maus nach Immunisierung mit rhG6PI und abgeklungener Arthritis an Tag 22 nach Immunisierung. Histologisch konnte kein aktiver inflammatorischer Prozess mehr beobachtet werden. Regenerative Prozesse wie Fibrose und Knorpelregeneration überwogen.

Wie im klinischen Verlauf wurde der höchste histologische Schweregrad der Arthritis zwischen den Tagen 12 und 15 festgestellt. An Tag 18 und 22 gab es kaum noch aktive inflam-

matorische Prozesse in den betroffenen Gelenken. Der Arthritisgrad von $6,0 \pm 2,0$ an Tag 18 und $4,3 \pm 3,4$ an Tag 22 beruhte auf einer leichten Synovitis, Tenosynovitis und Periarthritis. Zu diesen Zeitpunkten fanden vor allem Reparaturprozesse in Form von Fibrose und Knorpelregeneration, wie in Abb. 4.12 dargestellt, statt. An den Tagen 26 und 30 konnten nur noch Reparaturprozesse beobachtet werden.

4.2.4 Histologische Analyse nicht-suszeptibler Mausstämme nach Immunisierung mit Glukose-6-phosphat Isomerase

Von allen untersuchten Mausstämmen entwickelten nur die DBA/1 Mäuse klinische Zeichen einer Arthritis. Obwohl die anderen untersuchten Stämme keine klinischen Zeichen einer Arthritis zeigten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Immunisierung mit rhG6PI zu einer Infiltration inflammatorischer Zellen der distalen Gelenke führte. Stämme, die keine klinischen Zeichen einer Arthritis zeigten, wurden an den Tagen 10, 20 und 30 nach Immunisierung histologisch untersucht. Zur Kontrolle wurden Tiere der unterschiedlichen Stämme auch mit PBS in CFA immunisiert und an Tag 40 histologisch untersucht. In Abb. 4.13 werden die HE-Färbungen der Gelenkschnitte eines Gelenks einer Hinterpfote der untersuchten Mausstämme an Tag 10 nach Immunisierung mit rhG6PI dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt entwickelten die DBA/1 Mäuse schon eine massive Entzündung inklusive Knorpel- und Knochendestruktion. Die hier untersuchten Stämme zeigten dagegen keine Infiltration inflammatorischer Zellen in den Gelenkspalt. Die Synovialmembran war nicht aktiviert und nicht verdickt. Knorpel und Knochen zeigten keine Merkmale einer Destruktion. Auch das umliegende Gewebe war unauffällig. Nach oben eingeführter Arthritis-Skalierung erreichten alle Tiere der unterschiedlichen Stämme einen Arthritisgrad von 0 nach Immunisierung mit rhG6PI, was dem Normalbefund entsprach. Gleiches galt für die Kontrolltiere, die mit PBS in CFA immunisiert wurden. Auch die anderen Gelenke, die nicht in Abb. 4.13 dargestellt sind, waren unauffällig. Die Analyse der anderen Mausstämme an den Tagen 20 und 30 nach Immunisierung mit rhG6PI lieferte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Immunisierung mit rhG6PI führte in den Stämmen B10.A, B10.Q, BALB/c, DR4mix und C57BL/6 nicht zu der Induktion einer Arthritis.

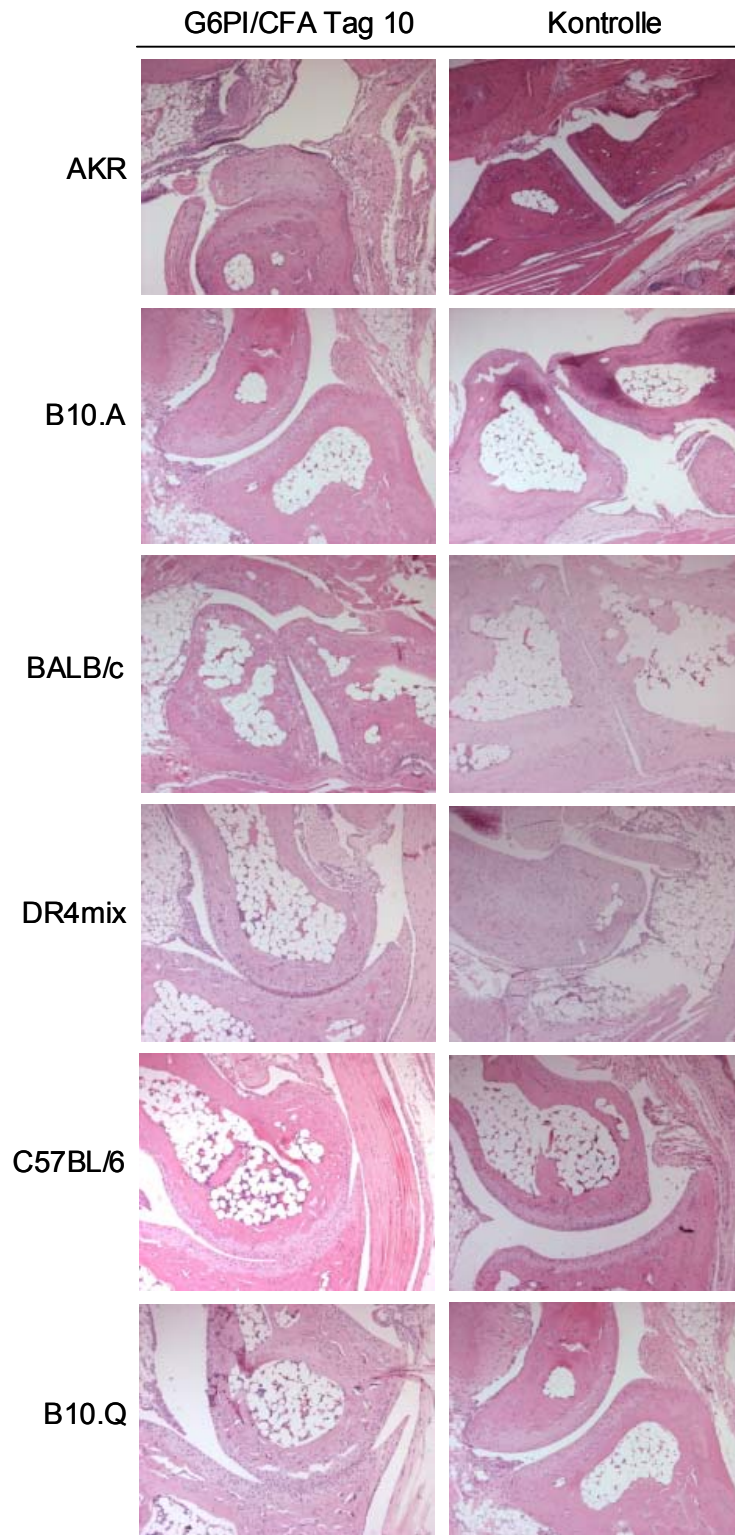


Abb. 4.13: Keine Infiltrate in den Gelenken der klinisch unauffälligen Mausstämmen nach G6PI Immunisierung. Unterschiedliche Mausstämmen wurden mit rhG6PI immunisiert, um eine Arthritis zu induzieren. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Gelenke der Vorder- und Hinterläufe der Mäuse histologisch untersucht. Gezeigt wird eine HE-Färbung (100fache Vergrößerung) der Gelenkschnitte einer hinteren Pfote von den Mausstämmen B10.A, B10.Q, AKR, DR4mix, BALB/c und C57BL/6 an Tag 10 nach Immunisierung mit G6PI in CFA. Zum Vergleich werden Gelenkschnitte der gleichen Mausstämmen gezeigt 40 Tage nach Immunisierung mit PBS in CFA. Pro Zeitpunkt wurden zwei Tiere jedes Stammes untersucht. In keinem der Gelenke konnte eine Infiltration inflammatorischer Zellen beobachtet werden.

4.2.5 Histologische Analyse der inneren Organe und Wirbelsäule von DBA/1 Mäusen nach Arthritisinduktion

Die Immunisierung mit rhG6PI führte zu einer schweren Arthritis in DBA/1 Mäusen, die vom pathologischen Befund viele histologische Merkmale der RA im Menschen widerspiegelte. Neben der rheumatoiden Arthritis existieren noch andere Arthritiden wie z.B. die ankylosierende Spondylitis, bei der die Gelenke der Wirbelsäule befallen werden. Daneben existieren auch Autoimmunerkrankungen bei denen die inneren Organe betroffen sind, wie z.B. beim systemischen Lupus Erythematos (SLE). Hier sollte untersucht werden, ob die Immunisierung mit rhG6PI auch zu einer Entzündung der inneren Organe oder der Wirbelsäule führt. Dazu wurden DBA/1 Mäuse mit rhG6PI immunisiert und eine Arthritis induziert.

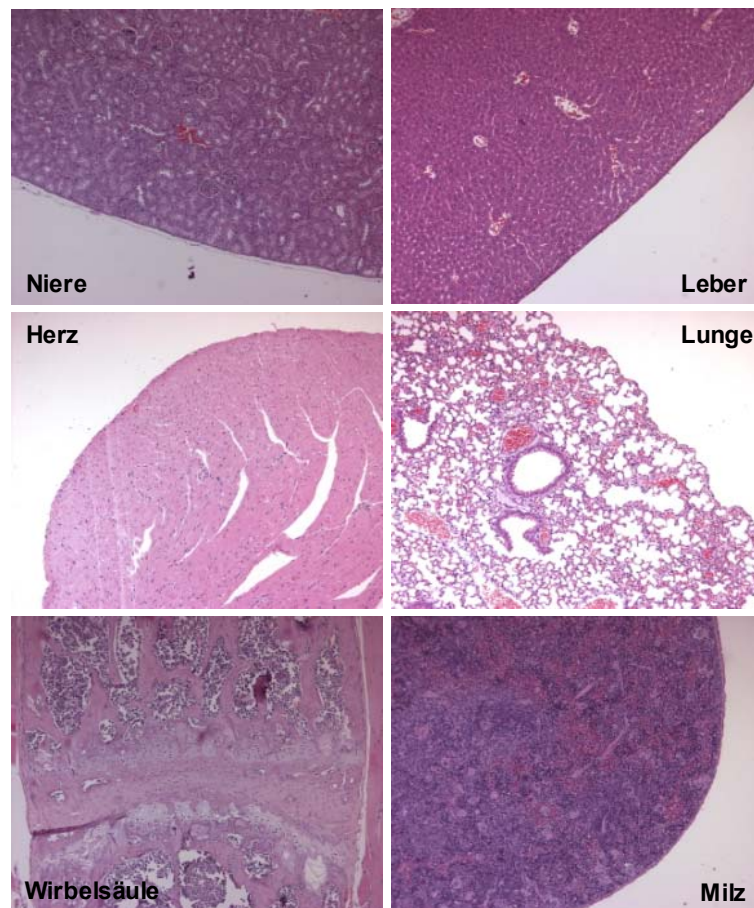


Abb. 4.14: Keine Entzündung der inneren Organe und Wirbelsäule in der G6PI-induzierten Arthritis. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. An den Tagen 9, 12, 15, 18, 22, 26 und 30 nach Immunisierung wurden die inneren Organe und die Wirbelsäule von je drei Tieren histologisch untersucht. Gezeigt wird eine HE-Färbung (100fache Vergrößerung) von Schnitten der Milz, Leber, Herz, Lunge, Niere und Wirbelsäule einer DBA/1 Maus mit Arthritis an Tag 12 nach Immunisierung mit rhG6PI. Weder in den Gelenken der Wirbelsäule noch in den inneren Organen konnte eine inflammatorische Aktivität beobachtet werden.

An den Tagen 9, 12, 15, 18, 22, 26 und 30 wurden die inneren Organe und die Wirbelsäule von je drei Tieren histologisch untersucht. Zur Kontrolle wurden DBA/1 Mäuse mit PBS in CFA immunisiert. In Abb. 4.14 sind beispielhaft HE-Färbungen der inneren Organe und der

Wirbelsäule einer DBA/1 Maus an Tag 12 nach Immunisierung mit rhG6PI dargestellt. Zu den untersuchten Organen zählten die Milz, Lunge, Herz, Leber und Niere. In keinem dieser Organe konnte eine Infiltration inflammatorischer Zellen an Tag 12 nach Immunisierung beobachtet werden. Dieser Befund konnte auch an den anderen Tagen, an denen die Tiere untersucht wurden, und in den Kontrolltieren beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Befund der Wirbelsäule war unauffällig. Die Immunisierung mit rhG6PI führte zu schweren Inflammation der distalen Gelenke der Vorder- und Hinterläufe. Die inneren Organe wie Leber, Niere, Herz, Milz und Lunge sowie die Wirbelsäule waren nicht betroffen.

4.2.6 Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen mit rekombinanter muriner Glukose-6-phosphat Isomerase

Die bisher beschriebenen Experimente zeigten, dass DBA/1 Mäuse nach Immunisierung mit rekombinanter humaner G6PI, also heterologer G6PI, eine schwere Arthritis entwickelten. Die Homologie zwischen humaner und muriner G6PI beträgt 88%. Hier sollte durch Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit rekombinanter muriner G6PI versucht werden, eine Arthritis auch mit autologer G6PI zu induzieren. Nach Immunisierung wurden die Tiere über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Zum Vergleich wurden DBA/1 Mäuse mit rhG6PI immunisiert.

In Abb. 4.15 sind die klinischen Verläufe beider Gruppen dargestellt. Wie in Kapitel 4.2.2 schon beschrieben, entwickelten die DBA/1 Mäuse 9 Tage nach Immunisierung mit rhG6PI erste klinische Anzeichen einer Arthritis. An Tag 12 erreichten diese Tiere einen maximalen mittleren klinischen Grad der Arthritis von $6,4 \pm 0,6$. Anschließend nahm der klinische Grad der Arthritis kontinuierlich ab und erreichte an Tag 30 einen Wert von $0,3 \pm 0,3$. In diesem Experiment lag die Inzidenz der mit rhG6PI immunisierten Tiere bei 100%. Auch die Tiere, die mit rmG6PI immunisiert wurden, entwickelten exakt nach 9 Tagen eine Arthritis. Die Inzidenz der Arthritis lag bei diesen Tieren bei 80%, da nur 8 von 10 Tieren erkrankten. Der klinische Verlauf der Arthritis ähnelte stark der rhG6PI immunisierten Gruppe. Zwischen den Tagen 9 und 10 nach Immunisierung war der klinische Verlauf zwischen beiden Gruppen fast deckungsgleich. An Tag 11 erreichten die mit rmG6PI immunisierten Tiere einen mittleren Arthritisgrad von $4,6 \pm 1,1$, der dann bis Tag 17 nur langsam auf $5,1 \pm 0,8$ anstieg. Die klinischen Verläufe zeigten keine signifikanten Unterschiede auf. Der Mann-Whitney Test lieferte immer P-Werte $> 0,05$. Beginnend vom Tag 18 nahm der Arthritisgrad der rmG6PI immuni-

sierten Tiere kontinuierlich ab und erreichte an Tag 30 einen Arthritisgrad von $1,1 \pm 0,3$. Auch die murine G6PI ist in der Lage eine Arthritis in DBA/1 Mäusen zu induzieren.

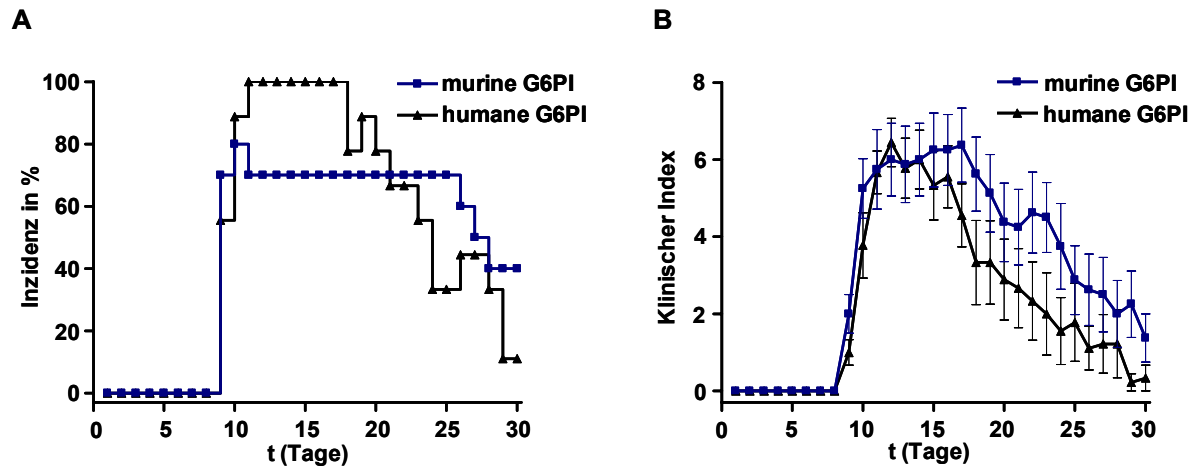


Abb. 4.15: Murine G6PI induziert Arthritis in DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden mit rekombinanter muriner G6PI (Quadrate) oder rekombinanter humaner G6PI (Dreiecke) immunisiert und über 30 Tage beobachtet. 8/10 DBA/1 Mäuse nach Immunisierung mit rmG6PI und 9/9 DBA/1 Mäuse nach Immunisierung mit rhG6PI entwickelten eine Arthritis (A). Der klinische Verlauf zwischen beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede auf, da der Mann-Whitney Test zu jedem Zeitpunkt $P > 0,05$ lieferte (B). Im klinischen Verlauf wurden nur die Tiere dargestellt, die auch erkrankten.

4.2.7 Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen mit denaturierter humaner Glukose-6-phosphat Isomerase

Die bisher gezeigte Arthritisinduktion wurde immer mit nativ aufgereinigter muriner oder humaner G6PI durchgeführt. Für G6PI wurde ein Rezeptor beschrieben, der auch auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird und in der Lage sein soll, Immunantworten zu modulieren. Um zu untersuchen, ob auch bei der Arthritisinduktion mit rhG6PI die native Form der G6PI bei der Pathogenese der Arthritis eine Rolle spielt, sollte die Arthritisinduktion zwischen nativer und denaturierter rhG6PI verglichen werden. Dazu wurde G6PI durch Kochen denaturiert. DBA/1 Mäuse wurden anschließend mit nativer oder mit denaturierter rhG6PI immunisiert und der klinische Verlauf über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Abbildung 4.16 zeigt den klinischen Verlauf beider Gruppen. Bei den Tieren, die mit nativer rhG6PI immunisiert wurden, handelt es sich um die gleiche Gruppe, die schon in Kapitel 4.2.6 beschrieben wurde. Die Tiere entwickelten nach 9 Tagen eine Arthritis, die ihren maximalen Arthritisgrad an Tag 12 erreichte und dann langsam abnahm.

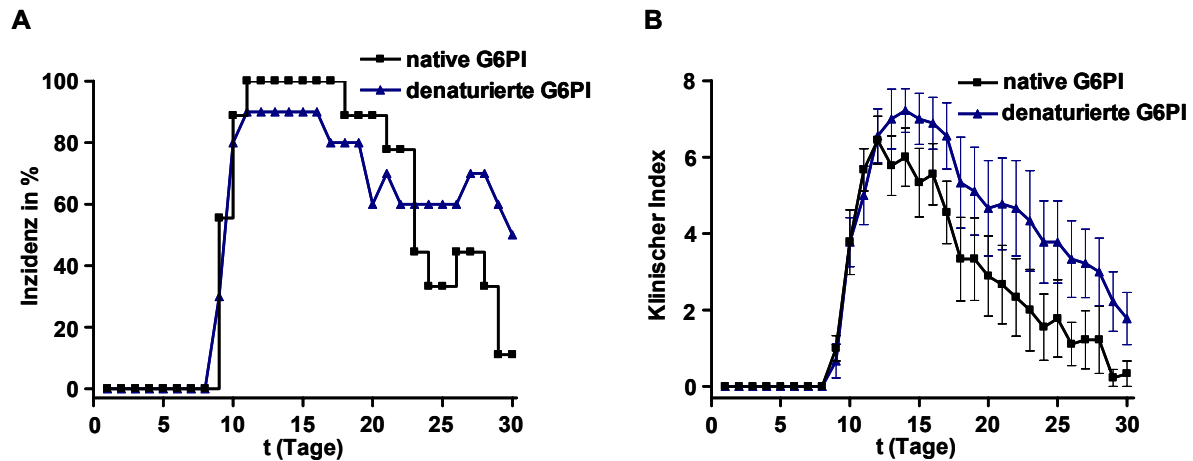


Abb. 4.16: Arthritisinduktion mit denaturierter rhG6PI. DBA/1 Mäuse wurden mit nativer rhG6PI (Quadrat) oder denaturierter rhG6PI (Dreieck) immunisiert und über 30 Tage auf die Entwicklung einer Arthritis beobachtet. 9/9 DBA/1 Mäuse immunisiert mit nativer rhG6PI bzw. 9/10 DBA/1 Mäuse immunisiert mit denaturierter rhG6PI entwickelten eine Arthritis (A). Der klinische Verlauf beider Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede auf ($P > 0,05$)(B).

Auch die Tiere, die mit gekochter denaturierter rhG6PI immunisiert wurden, entwickelten nach 9 Tagen erste klinische Anzeichen einer Arthritis. Die Arthritis erreichte ihr klinisches Maximum an Tag 14 mit einem mittleren Arthritisgrad von $6,5 \pm 0,9$. Anschließend nahm die Arthritis wie auch in den Tieren, die mit nativer rhG6PI immunisiert wurden langsam ab. An Tag 20 wurde nur noch ein Arthritisgrad von $4,2 \pm 1,3$ gemessen und an Tag 30, dem Ende des Beobachtungszeitraumes, ein Arthritisgrad von $1,6 \pm 0,6$. Die Inzidenz bei den Tieren, die mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden, betrug 90%, da 9/10 Tieren eine Arthritis entwickelten, und war vergleichbar mit den Tieren, die mit nativer G6PI immunisiert wurden. Die klinischen Verläufe zeigten keine signifikanten Unterschiede auf. Eine statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney Tests lieferte zu jedem Zeitpunkt einen P-Wert $> 0,05$.

4.2.8 Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen mit Kaninchen Glukose-6-phosphat Isomerase

Die Immunisierung mit rekombinanter humaner oder muriner G6PI induzierte eine Arthritis in DBA/1 Mäusen. Diese Proteine wurden in einem prokaryotischen Expressionssystem im *E.coli* Stamm BL21(DE3) produziert und über eine 6 Histidinmarkierung am N-Terminus über eine Nickelsäule aufgereinigt. Um auszuschließen, dass die beobachtete Arthritis in DBA/1 Mäusen durch mikrobielle Verunreinigungen bzw. die Histidinmarkierung am N-Terminus der Proteine induziert wurde, wurden DBA/1 Mäuse mit kommerziell erhältlicher G6PI aus dem Muskel von Kaninchen immunisiert. Die Kaninchen G6PI enthält keine mikro-

biellen Rückstände und auch keine Histidinmarkierung am N-Terminus. Trotzdem ist das Protein nicht rein und enthält Kontaminationen in Form anderer Proteine aus dem Muskel (siehe 4.1.3). Die Homologie zwischen humaner und Kaninchen G6PI beträgt 92%. Abb. 4.17 zeigt den klinischen Verlauf der DBA/1 Tiere, die mit Kaninchen G6PI immunisiert wurden.

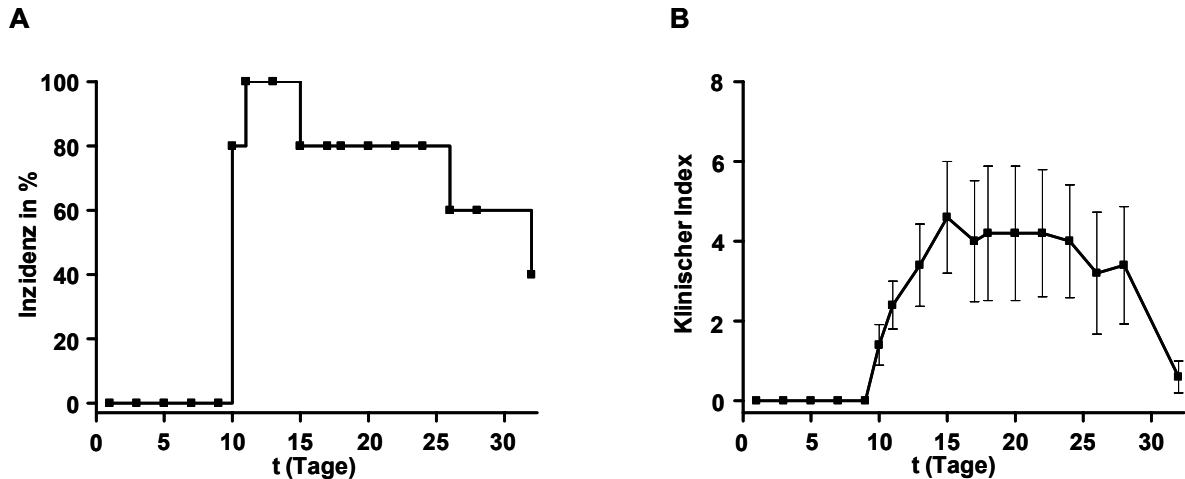


Abb. 4.17: Arthritisinduktion mit Kaninchen G6PI. 5 DBA/1 Mäuse wurden mit Kaninchen G6PI immunisiert und über einen Zeitraum von 32 Tagen auf klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet. Alle Tiere entwickelten nach 10 Tagen eine Arthritis (A), die an Tag 15 ihr Maximum erreichte und bis Tag 24 auf diesem Niveau blieb (B). An Tag 30 waren kaum noch klinische Zeichen einer Arthritis zu beobachten.

Alle fünf Tiere entwickelten nach 10 Tagen eine Arthritis, die an Tag 15 ihren maximalen mittleren Arthritisgrad von $4,6 \pm 1,4$ erreichte. Anschließend blieb der mittlere Arthritisgrad ungefähr gleich und hatte an Tag 22 noch einen Wert von $4,2 \pm 1,6$. Erst nach Tag 26 fiel der mittlere Arthritisgrad rapide ab und erreichte an Tag 32 einen Wert von $0,6 \pm 0,4$.

4.2.9 Enzymaktivität der Glukose-6-phosphat Isomerase im Serum unterschiedlicher Mausstämme

Der DBA/1 Stamm war der einzige Stamm der nach Immunisierung mit rhG6PI in der Mehrzahl der Mäuse eine Arthritis entwickelte. Alle anderen Stämme waren nicht-suszeptibel. Nun sollte untersucht werden, ob sich die Konzentration der G6PI im Serum der suszeptiblen DBA/1 Mäuse und den nicht-suszeptiblen Stämmen BALB/c und C57BL/6 Mäusen unterscheidet. Die enzymatische Aktivität der G6PI wurde über die Umsetzung von NADP bei 340nm photometrisch bestimmt. Mit diesem Verfahren wurde auch die enzymatische Aktivität der rekombinanten hergestellten G6PI bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die geringste Enzymaktivität und damit auch die geringste Konzentration an G6PI im Serum wurde bei BALB/c Mäusen ermittelt (Abb. 4.18). Hier betrug die Aktivität der G6PI $0,47 \pm 0,09$ U/ml. Die Aktivität der G6PI im Serum von DBA/1 Mäusen betrug $0,59 \pm 0,16$ U/ml. Die höchste Enzymaktivität des Serums konnte dagegen bei den C57BL/6 Mäusen gemessen werden.

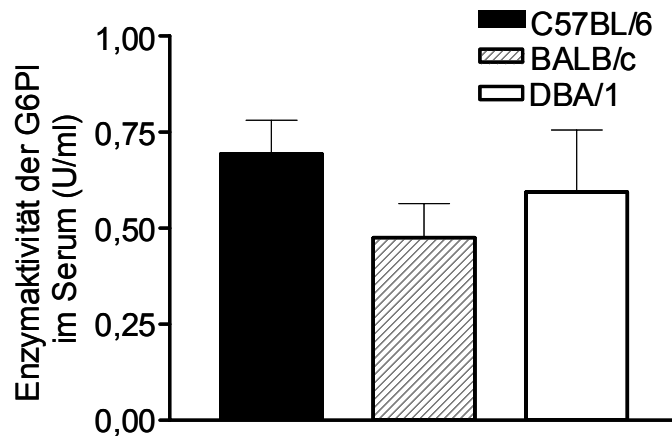


Abb. 4.18: Aktivität der Glukose-6-phosphat Isomerase im Serum. Serum aus je 3 naiven DBA/1, BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurde gewonnen. Die Aktivität der G6PI im Serum wurde enzymatisch bestimmt. Je Stamm wurden 3 Tiere untersucht.

Im Serum dieser Mäuse konnte eine Enzymaktivität der G6PI von $0,69 \pm 0,09$ U/ml gemessen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Enzymaktivitäten der drei untersuchten Stämme alle im gleichen Bereich zwischen 0,47 und 0,69 U/ml liegen.

4.3 Die Rolle der B-Zellen, der Antikörper und des Komplements in der G6PI-induzierten Arthritis

4.3.1 Die humorale Immunantwort gegen Glukose-6-phosphat Isomerase in DBA/1 Mäusen und nicht suszeptiblen Stämmen

Hier sollten die Antikörperantworten gegen murines und humanes G6PI in dem suszeptiblen DBA/1 Mausstamm und den nicht-suszeptiblen Mausstämmen nach rhG6PI Immunisierung gemessen werden. Dadurch sollte untersucht werden, ob die Suszeptibilität mit der unterschiedlichen Fähigkeit zur Produktion von anti-G6PI Antikörpern in den untersuchten Mausstämmen zusammenhängt. Zu diesem Zweck wurden Mäuse unterschiedlicher Stämme mit rhG6PI immunisiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Serum gewonnen. Das gewonnene Serum wurde im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern getestet. Dazu wurde rhG6PI oder rmG6PI an ELISA Platten gebunden, mit seriellen Verdünnungen von Seren immunisierter Mäuse inkubiert und die Bindung von IgG detektiert. Abb. 4.19 zeigt die Antikörpertiter von DBA/1 Mäusen gegen rhG6PI oder rmG6PI zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung mit rhG6PI. An Tag 3 nach Immunisierung mit rhG6PI waren noch keine Antikörper gegen rhG6PI oder gegen rmG6PI messbar.

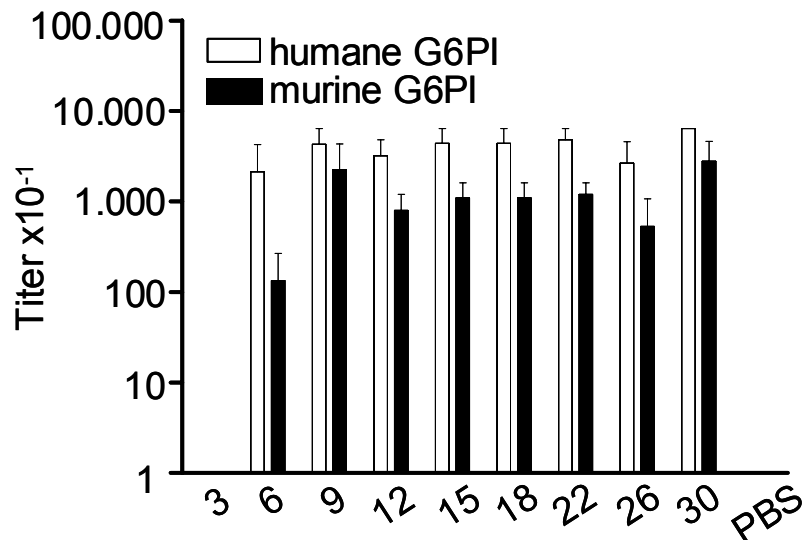


Abb. 4.19: IgG-Antwort gegen rhG6PI oder rmG6PI in DBA/1 Mäusen nach Immunisierung mit rhG6PI. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden von je drei Tieren Serum gewonnen, seriell verdünnt und die IgG-Antwort gegen rmG6PI (gefüllte Balken) und rhG6PI (offene Balken) im ELISA gemessen. Die höchste Serumverdünnung bei der anti-G6PI Antikörper noch detektierbar waren, wurden als Mittel \pm SEM dargestellt.

Erste erhöhte Konzentrationen von anti-G6PI IgG Antikörpern im Serum wurden an Tag 6 gemessen. Dabei konnte schon ein hoher IgG Titer gegen rhG6PI gemessen werden, der bei 1:2.133 lag, während der IgG Titer gegen rmG6PI noch deutlich niedriger bei 1:134 lag. Von Tag 9 an konnten sowohl gegen rhG6PI als auch gegen rmG6PI hohe Titer gemessen werden, die über den gesamten Beobachtungszeitraum hoch blieben. Die Titer schwankten dabei gegen rhG6PI von 1:2.667 an Tag 26 bis 1:6.400 an Tag 30. Gegen rmG6PI variierten die Titer zwischen 1:534 an Tag 26 und 1:2.800 an Tag 30. Insgesamt waren die IgG-Titer in DBA/1 Mäusen nach Immunisierung mit rhG6PI gegen rhG6PI zu jedem untersuchtem Zeitpunkt höher als gegen rmG6PI. In gleicher Weise wurden auch die nicht-suszeptiblen Stämme auf die Produktion von anti-G6PI Antikörpern untersucht. In Abb. 4.20 A sind die Antikörpertiter nicht-suszeptibler Stämme nach Immunisierung mit rhG6PI gegen humanes G6PI dargestellt. Wie bei den DBA/1 Mäusen war an Tag 3 noch kein erhöhter Antikörpertiter gegen rhG6PI messbar. Erst an Tag 6 zeigten der AKR und der B10.Q Stamm erhöhte Titer von 1:50. Alle anderen getesteten Stämme (SWR, C57BL/6, BALB/c und B10.A) entwickelten zu diesem Zeitpunkt noch keine messbaren Titer gegen rhG6PI. Beginnend von Tag 10 konnte dann bei allen getesteten Stämmen ein erhöhter Titer gemessen werden, wobei die AKR Tiere mit 1:850 den niedrigsten und die C57BL/6 Tiere mit 1:16.000 den höchsten Titer aufwiesen. An den Tagen 20 und 30 nahmen die Titer gegen rhG6PI bei allen untersuchten Stämmen zu. An

Tag 20 entwickelten die B10.A Mäuse mit 1:6.400 den niedrigsten und die C57BL/6 Tiere mit 1:54.400 den höchsten Titer. An Tag 30 hatten die B10.Q mit 1:16.000 den niedrigsten und die AKR mit 1:256.000 den höchsten Titer. Außerdem wurden auch die Antikörpertiter gegen rmG6PI in nicht-suszeptiblen Mausstämmen nach rhG6PI Immunisierung untersucht. Erste Titer gegen rmG6PI entwickelten sich bei allen Stämmen von Tag 10 an (Abb. 4.20 B). An Tag 10 produzierten die BALB/c Mäuse mit 1:50 den niedrigsten und die C57BL/6 Tiere mit 1:3.250 den höchsten Titer. Wie beim rhG6PI nahmen die Titer an Tag 20 und Tag 30 weiter zu.

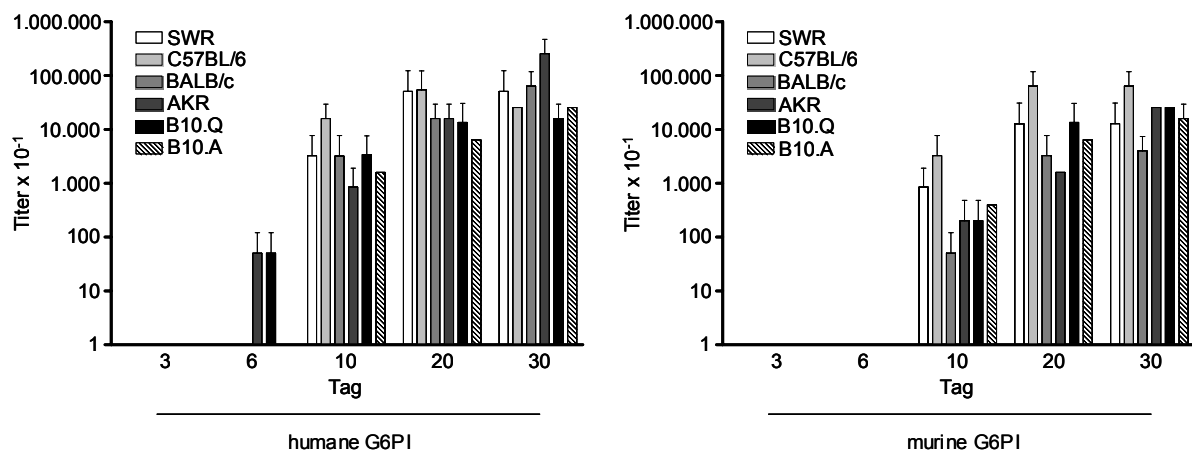


Abb. 4.20: Auch die nicht-suszeptiblen Stämme entwickeln Antikörper gegen G6PI. Mäuse nicht-suszeptibler Mausstämmen für die G6PI-induzierte Arthritis wurden mit rhG6PI immunisiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde von je zwei Tieren Serum gewonnen, seriell verdünnt und die IgG-Antwort gegen rhG6PI (Abbildung A) und rmG6PI (Abbildung B) im ELISA gemessen. Die höchste Serumverdünnung bei der anti-G6PI Antikörper noch detektierbar waren, wurden als Mittel \pm SEM dargestellt.

An Tag 20 hatten die AKR mit 1:1.600 den niedrigsten und die C57BL/6 mit 1:64.000 den höchsten Titer. An Tag 30 konnten bei den BALB/c Mäusen mit einem Titer von 1:4.000 die geringste und wieder bei den C57BL/6 mit 1:640.000 die höchste Konzentration an anti-rmG6PI Antikörpern gemessen werden. Alle Stämme entwickelten anti-G6PI IgG Titer sowohl gegen rhG6PI als auch gegen rmG6PI nach Immunisierung mit rhG6PI, und die Konzentrationen nahmen im Lauf der Zeit zu bzw. blieben konstant hoch. Die Titer gegen rhG6PI waren dabei immer höher als gegen rmG6PI. Die Antikörperantwort gegen rhG6PI und gegen rmG6PI trat in den nicht-suszeptiblen Stämmen im Gegensatz zu den DBA/1 Mäusen etwas verzögert ein. Erste Titer gegen rmG6PI wurden erst an Tag 10 gemessen. An Tag 6 entwickelten erst 2 von 6 Stämmen Antikörper gegen rhG6PI.

4.3.2 Die unterschiedlichen Isotypen der anti-G6PI Antikörper nach Arthritisinduktion in DBA/1 Mäusen

Im K/BxN- und im CIA-Modell ist der Transfer der Arthritis durch Transfer von IgG₁ Antikörpern gegen G6PI im K/BxN-Modell oder IgG₂ Antikörper gegen Kollagen II im CIA-Modell möglich. Im Folgenden wurde untersucht welche Isotypen die gegen G6PI gebildeten Antikörper haben. Dazu wurden DBA/1 Mäuse mit rhG6PI immunisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Serum gewonnen. Dieses Serum wurde seriell verdünnt und in einem isotypspezifischen ELISA auf die Anwesenheit G6PI spezifischer Antikörper hin untersucht. Der erste untersuchte Zeitpunkt war Tag 6, da zuvor noch keine Antikörper gegen rhG6PI messbar waren (siehe voriges Kapitel).

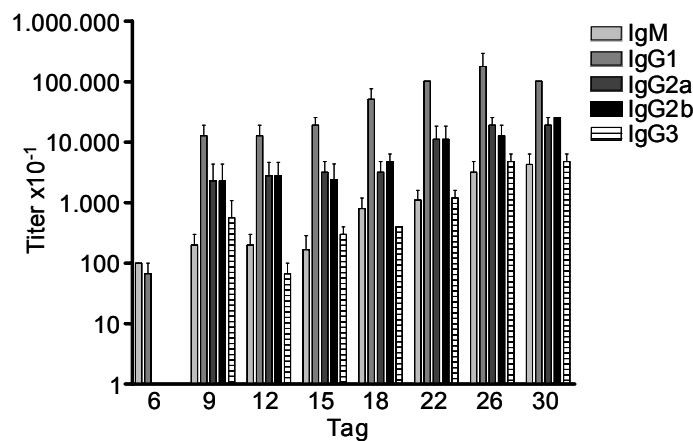


Abb. 4.21: Antikörperantwort unterschiedlicher Ig-Isotypen gegen rhG6PI nach Immunisierung mit rhG6PI in DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde von 3 Mäusen Serum gewonnen. Das Serum wurde seriell verdünnt und im ELISA auf die Anwesenheit isotypspezifischer anti-rhG6PI Antikörper getestet. Die Antikörpertiter der unterschiedlichen Isotypen zu jedem Zeitpunkt wurden als Mittel \pm SEM dargestellt.

An Tag 6 wurde ein erhöhter Antikörpertiter nur gegen IgM und IgG₁ gemessen. Der Titer des anti-G6PI-IgM lag bei 1:100 und der anti-G6PI-IgG₁ Titer bei 1:67. Von Tag 9 an wurden anti-G6PI Antikörper aller untersuchter Isotypen detektiert. Der Titer der IgM Antikörper lag dabei bei 1:200. Der höchste Titer konnte bei IgG₁ gemessen werden und lag bei 1:12.800. Die Antikörper der Subklassen IgG_{2a} und IgG_{2b} entwickelten jeweils einen Titer von 1:2.300. Auch IgG₃ wurde schon detektiert und entwickelte einen Titer von 1:567. Dieses Höhe der Titer blieb für die untersuchten Isotypen auch an den Tagen 12 und 15 in diesem Bereich. Erst von Tag 18 an nahmen die Antikörpertiter der untersuchten Isotypen zu. Die höchsten Titer wurden zwischen Tag 26 und 30 beobachtet. IgM erreichte seinen höchsten anti-G6PI Titer an Tag 30 mit einem Titer von 1:4.300. Das Gleiche galt für die Titer der IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ Subklassen. Die anti-G6PI Antikörper der Subklasse IgG_{2a} entwickelten an Tag 30 einen Titer von 1:19.200, der Subklasse IgG_{2b} einen Titer von 1:25.600 und der Subklasse IgG₃ einen

Titer von 1:4.800. Die anti-G6PI Antikörper der Subklasse IgG₁ produzierten die höchsten Antikörpertiter an Tag 26 mit einem Titer von 1:179.200. Von Tag 6 an wurden immer anti-G6PI Antikörper der Isotypen IgM und IgG₁ gemessen. Ab Tag 9 entwickelten die IgG₁ Antikörper zu jedem Zeitpunkt die höchsten anti-G6PI Titer. IgG₁ Antikörper waren der vorherrschende Isotyp nach Immunisierung mit rhG6PI. Danach folgten die Antikörper der IgG_{2a} und IgG_{2b} Subklasse, die von Tag 9 an immer ungefähr gleiche Titer produzierten. Die geringste Konzentration an anti-G6PI Antikörpern nach Immunisierung mit rhG6PI wurde von der Subklasse IgG₃ gemessen.

4.3.3 Bildung von Rheumafaktoren, dsDNS-Antikörpern sowie anti-Kollagen Antikörpern nach Arthritisinduktion

Ca. 60-80 % der Patienten mit rheumatoider Arthritis produzieren sogenannte Rheumafaktoren. Bei anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen z.B. dem systemischen Lupus Erythematos (SLE) aber auch bei Patienten mit RA findet man IgG-Antikörper gegen doppelsträngige DNS (anti-dsDNS). Außerdem werden bei entzündlichen Immunreaktionen in den Gelenken häufig auch Antikörper gegen das in den Gelenken vorkommende Kollagen II gebildet.

Daher sollte untersucht werden, ob DBA/1 Mäuse nach Arthritisinduktion durch rhG6PI Rheumafaktoren, Antikörper gegen doppelsträngige DNS bzw. gegen Kollagen II entwickeln. Serum aus 35 DBA/1 Mäusen wurde 14-18 Tage nach Immunisierung mit rhG6PI gewonnen und gemischt. Im ELISA wurde dieses Serum seriell verdünnt und auf die Anwesenheit von gegen IgG gerichtete IgM Antikörper, sogenannte Rheumafaktoren, getestet (Abb. 4.22 A). Zur Kontrolle wurde Serum einer MRL/lpr Maus verwendet, die spontan Rheumafaktoren und Antikörper gegen doppelsträngige DNS bilden. Bis zu einer Serumverdünnung von 1:800 des Serum der MRL/lpr Maus wurden erhöhte Antikörpertiter gegen IgG gemessen. Dagegen zeigte das gemischte Serum der DBA/1 Mäuse keine erhöhte Konzentration von IgM Antikörpern, die gegen IgG gerichtet waren. Selbst bei einer Verdünnung von 1:100 lag die Absorption bei 450nm immer noch auf dem Niveau des Hintergrundes. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den gegen dsDNS gerichteten Antikörpern (Abb. 4.22 B). Das Serum der MRL/lpr Maus zeigte schon bei einer Verdünnung von 1:6.400 eine erhöhte Konzentration von anti-dsDNS Antikörpern an. Da 1:6.400 die höchste getestete Verdünnung war, lag der Titer möglicherweise noch höher. Das Serum der DBA/1 Mäuse dagegen zeigte bei einer Verdünnung von 1:100 eine dreimal so große Absorption wie die Absorption des Hintergrundes.

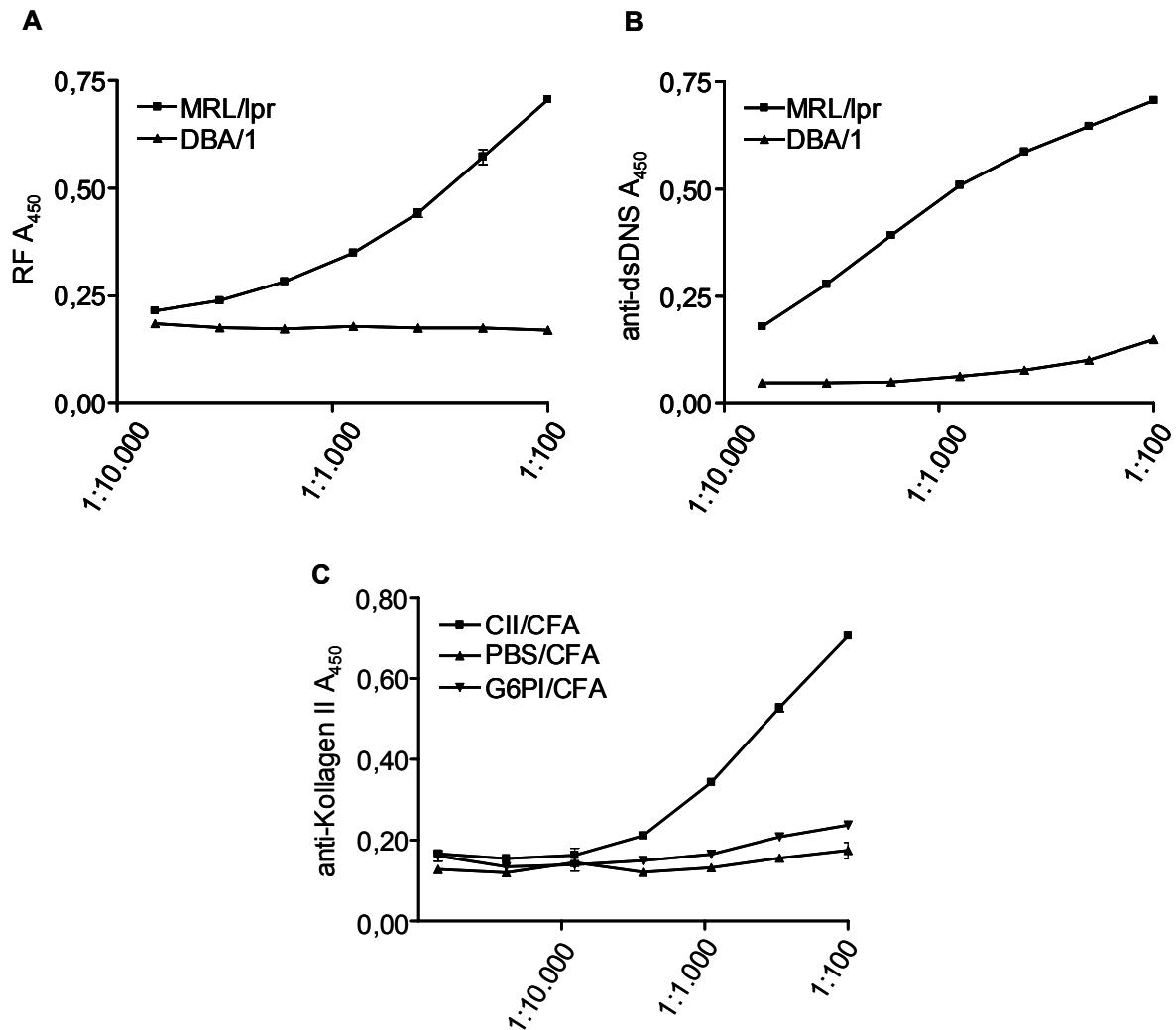


Abb. 4.22: Die Bildung von anti-dsDNS- und anti-Kollagen II Antikörpern sowie Rheumafaktoren nach Arthritisinduktion. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. Zwischen den Tagen 14-18 nach Immunisierung wurde Serum von 35 Mäusen mit Arthritis gewonnen und gemischt. Außerdem wurde Serum aus einer 12 Wochen alten MRL/lpr Maus gewonnen. Im ELISA wurden die Seren seriell verdünnt und auf die Anwesenheit von Rheumafaktoren (anti-IgG-Maus-IgM) (A) und Antikörper gegen doppelsträngige DNS (anti-dsDNS-IgG) untersucht (B). Zusätzlich wurde Serum von einer mit PBS/CFA bzw. mit murinem Kollagen II/CFA (CII) immunisierten DBA/1 Maus gewonnen und im ELISA zusammen mit dem gemischtem Serum der Mäuse nach G6PI Immunisierung auf die Anwesenheit von anti-Kollagen-II Antikörpern untersucht (C).

Damit betrug der Titer 1:100. DBA/1 Mäuse entwickelten geringe Mengen an IgG Antikörpern, die gegen dsDNS gerichtet waren. Das gemischte Serum der kranken Tiere und das Serum der mit Kollagen II immunisierten DBA/1 Maus wurde auf die Anwesenheit von anti-Kollagen II Antikörpern getestet (Abb. 4.22 C). Um sicherzustellen, dass nicht schon allein die Immunisierung mit CFA zu erhöhten Titern gegen Kollagen II führte, wurde auch Serum einer PBS/CFA immunisierten DBA/1 Maus im ELISA untersucht. Sowohl das Serum der kranken DBA/1 Tiere, als auch das Serum der PBS/CFA immunisierten Maus zeigten bei einer Verdünnung von 1:100 keine erhöhte Antwort. Dagegen wurde in der mit murinem Kollagen II in CFA immunisierten Maus schon bei einer Verdünnung von 1:900 ein deutlich erhöhter Titer von Kollagen II Antikörpern festgestellt. DBA/1 Mäuse entwickelten 18 Tage

nach Immunisierung mit rhG6PI keine Rheumafaktoren und keine Antikörper gegen Kollagen II. Antikörper gegen dsDNS konnten nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden.

4.3.4 Transfer der Arthritis durch Transfer von Antikörpern in DBA/1 Mäusen

Im K/BxN-Modell ist es möglich, die Arthritis durch Transfer von geringen Mengen Serum arthritischer Mäuse in fast jeden Empfängerstamm zu transferieren. Die Rolle der gegen rhG6PI gebildeten Antikörper an der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis in DBA/1 Mäusen nach Immunisierung mit rhG6PI sollte untersucht werden. Mit Hilfe aufgereinigter Antikörper aus arthritischen DBA/1 Mäusen sollte versucht werden, die Krankheit zu transferieren. Zwischen Tag 14 und 18 nach Immunisierung wurde von Mäusen mit Arthritis Serum gewonnen. Die Antikörper in diesem Serum wurden über eine Protein G Säule aufgereinigt. Die Ig-Fraktion wurde in PBS verdünnt und unterschiedliche Mengen an Tag 0 und Tag 2 in DBA/1 Empfängermause i.p. transferiert. Der Transfer erfolgte entweder in naive DBA/1 Mäuse oder in DBA/1 Mäuse, die 7 Tage zuvor mit PBS/CFA immunisiert wurden. Einige der naiven DBA/1 Mäuse erhielten 2 Tage nach dem ersten Transfer 50µg LPS. Keines der je 2 naiven DBA/1 Tiere entwickelte nach Transfer von entweder 2 x 1mg oder sogar 2 x 5 mg aufgereinigtem IgG eine Arthritis (Tab. 4.3).

Transfer von aufgereinigtem IgG in DBA/1 Mäuse		
Menge	Zusätzliche Behandlung	Arthritisinduktion
2 x 1 mg	X	0/2
2 x 5 mg	X	0/2
2 x 2 mg	Transfer nach PBS/CFA Immunisierung an Tag -7	0/2
2 x 5 mg	Transfer nach PBS/CFA Immunisierung an Tag -7	0/2
2 x 1 mg	50µg LPS an Tag 2	0/2
2 x 2 mg	50µg LPS an Tag 2	0/2
2 x 5 mg	50µg LPS an Tag 2	0/1

Tab. 4.3: Transfer der Arthritis durch Transfer aufgereinigter Antikörper in DBA/1 Mäuse. Serum von DBA/1 Mäusen mit Arthritis 14-18 Tage nach Immunisierung mit rhG6PI wurde gewonnen und die Ig Fraktion über eine Protein G Säule aufgereinigt. Unterschiedliche Mengen der Ig-Fraktion wurden an Tag 0 und Tag 2 naiven DBA/1 Mäusen oder DBA/1 Mäusen, die 7 Tage zuvor mit PBS/CFA immunisiert wurden, i.p. in PBS verabreicht. Einige der naiven DBA/1 Mäuse erhielten 2 Tage nach der ersten Antikörpergabe zusätzlich 50µg LPS in PBS i.p. Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurden die Tiere auf klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet.

Auch nach Aktivierung durch PBS/CFA Immunisierung 7 Tage vor dem Transfer von 2 x 2mg oder 2 x 5mg zeigten die 2 Tiere in jeder Gruppe keine klinischen Zeichen einer Arthritis. Im K/BxN-Modell konnte die Effizienz des Antikörpertransfers gesteigert werden, wenn zusätzlich LPS gespritzt wurde. Aus diesem Grund wurden in der dritten Gruppe den Tieren 2 Tage nach dem ersten Transfer der Antikörper zusätzlich auch 50µg LPS injiziert. Je 2 Tiere dieser Gruppe erhielten 2 x 1mg und 2 x 2mg und ein Tier 2x 5mg. Auch in dieser Gruppe entwickelte keines der Tiere klinische Zeichen einer Arthritis. Da eine leichte inflammatorische Aktivität in den Gelenken sich nicht klinisch manifestieren musste, wurden die Tiere dieser Gruppe auch histologisch untersucht. In Abb. 4.23 werden Gelenkschnitte von DBA/1 Mäusen dargestellt, die 2x 5mg aufgereinigtes Ig und zusätzlich 2 Tage später auch 50µg LPS injiziert bekamen. Die Gelenkschnitte zeigten jedoch keine Infiltration inflammatorischer Zellen.

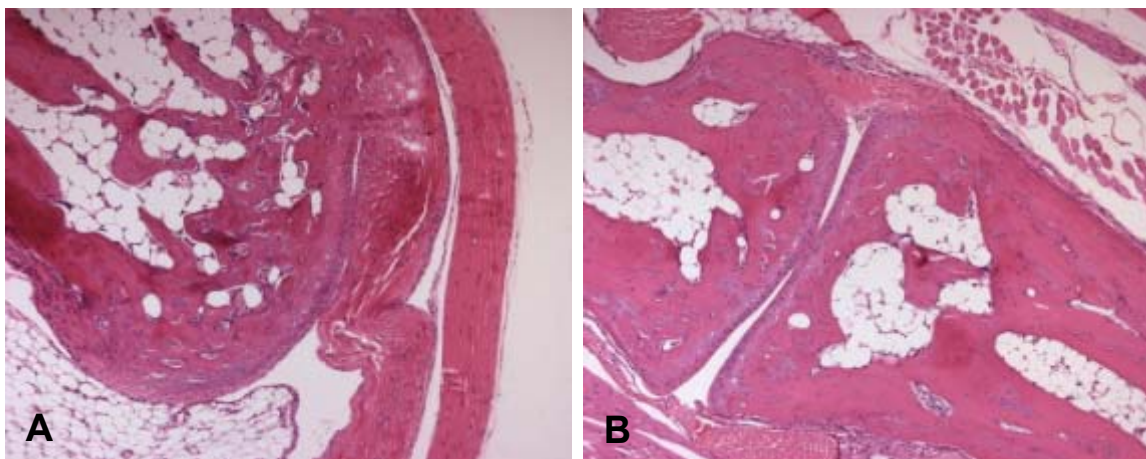


Abb. 4.23: Histologische Untersuchung einer hinteren Pfote nach Ig-Transfer und LPS-Aktivierung. Einer DBA/1 Maus wurde 2x5mg einer aus dem Serum von arthritischen DBA/1 Mäusen aufgereinigten Ig-Fraktion i.p. injiziert. Zusätzlich wurde dem Tier 50µg LPS i.p. an Tag 2 injiziert. Gezeigt sind HE-Schnitte (100x Vergrößerung) 24 Tage nach Ig-Transfer vom Fußknöchel (A) und von einem tarsalem Gelenk (B).

4.3.5 Die Rolle der Fcγ-Rezeptoren bei der Arthritisinduktion mit Glukose-6-phosphat Isomerase

Fcγ-Rezeptoren stellen eine wichtige Verbindung zwischen Antikörper-Antigen Komplexen und den zellulären Effektormechanismen der Zellen des Immunsystems dar. In der G6PI-induzierten Arthritis sollte untersucht werden, welche Rolle die Fcγ-Rezeptoren bei der Pathogenese der Arthritis spielen. Indirekt sollte damit auch die Rolle der produzierten Antikörper und deren Fähigkeit durch Vernetzen von Fcγ-Rezeptoren, die Pathogenese der Arthritis zu beeinflussen, untersucht werden.

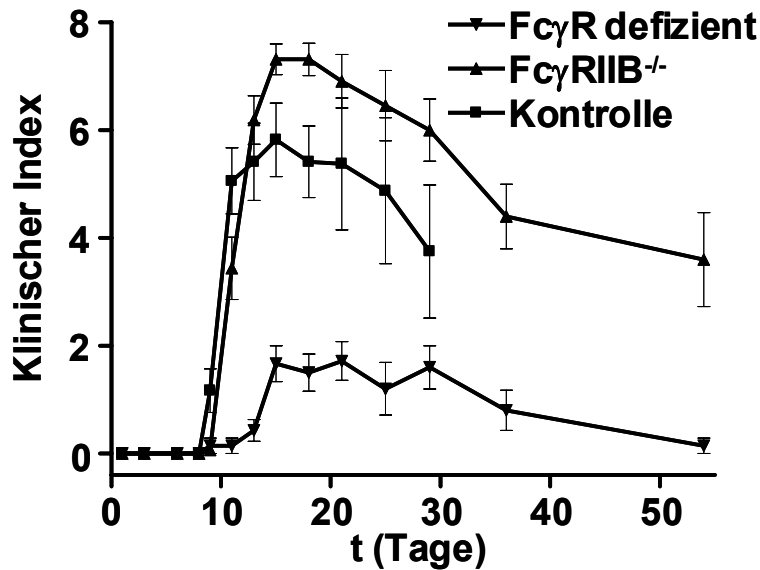


Abb. 4.24: Die Rolle der Fcγ-Rezeptoren in der G6PI-induzierten Arthritis. Wildtyp DBA/1 Mäuse, DBA/1 FcγRIIB^{-/-} Mäuse und DBA/1 Mäuse, die defizient für die gemeinsame γ-Kette waren wurden mit rhG6PI immunisiert und der klinische Verlauf der Arthritis über einen Zeitraum von 54 Tagen verfolgt. Gezeigt wird der mittlere klinische Index \pm SEM der Tiere, die eine Arthritis entwickelten. Die Inzidenz der Arthritis lag bei den Wildtyp DBA/1 Mäusen bei 10/11 Tieren, bei den FcγRIIB^{-/-} Mäusen bei 16/16 und 8/24 bei den DBA/1 Mäusen, die defizient für die gemeinsame γ-Kette waren.

Die Rolle des inhibierenden Fcγ-Rezeptors FcγRII wurde mit Hilfe von FcγRIIB^{-/-} Mäusen auf DBA/1 Hintergrund untersucht. Die Rolle der aktivierenden Fcγ-Rezeptoren FcγRI und FcγRIII wurde mit Hilfe eines Mausstammes auf DBA/1 Hintergrund untersucht, der defizient für die gemeinsame γ-Kette war. 16 FcγRIIB^{-/-} auf DBA/1 Hintergrund und 24 Mäuse auf DBA/1 Hintergrund, die defizient für die gemeinsame γ-Kette sind, wurden mit rhG6PI immunisiert. Zur Kontrolle wurde in 11 Wildtyp DBA/1 Tieren eine Arthritis induziert und der klinische Verlauf der Arthritisinduktion in den drei Gruppen über 30 Tage bei den Wildtypmäusen oder 54 Tage bei den FcγRIIB^{-/-} oder gemeinsame γ-Kette defizienten Mäuse auf DBA/1 Hintergrund beobachtet (Abb. 4.24). 10 von 11 Wildtyp DBA/1 Mäusen entwickelten an Tag 9 nach Immunisierung erste Anzeichen einer Arthritis. Der klinische Index nahm bis Tag 15 zu und erreichte dort sein Maximum bei $5,8 \pm 0,7$. Anschließend nahm der Schweregrad der Arthritis im klinischen Verlauf wieder langsam ab und erreichte an Tag 30 noch einen relativ hohen mittleren Schweregrad der Arthritis von $3,7 \pm 1,2$. In der Grafik wurden in allen drei Gruppen nur die Tiere dargestellt, die zu irgendeinem Zeitpunkt klinische Zeichen einer Arthritis zeigten. Nur 8/24 (33%) der Mäuse, die defizient für die gemeinsame γ-Kette waren, entwickelten zwischen den Tagen 9 und 13 schwache klinische Zeichen einer Arthritis. Erst an Tag 15 wurde ein mittlerer Arthritisgrad von $1,6 \pm 0,3$ gemessen, der bis Tag 29

relativ konstant blieb und zwischen $1,2 \pm 0,5$ an Tag 18 und $1,7 \pm 0,4$ an Tag 21 schwankte. Danach nahm der Schweregrad der Arthritis kontinuierlich bis auf $0,1 \pm 0,1$ an Tag 54 ab.

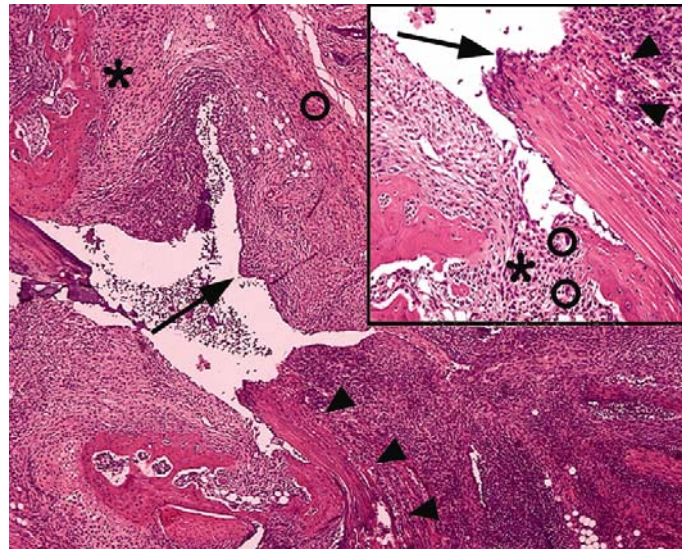


Abb. 4.25: HE-färbung eines Gelenkschnittes (100x Vergrößerung) an Tag 21 nach Arthritisinduktion in einer DBA/1 FcγRIIB^{-/-} Maus. DBA/1 FcγRIIB^{-/-} Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert und an Tag 21 histologisch untersucht. Gezeigt wurde eine schwere Synovitis (Pfeil), Periostitis (*), Tenosynovitis (Pfeilkopf) und Periarthritis (O) des Sprunggelenks an einer hinteren Pfote der Maus. Der eingefügte Schnitt zeigt einen Ausschnitt (200x Vergrößerung) aus dem Überblicksschnitt. Hier konnten deutlich multinukleäre Osteoklasten (O), eine gerissene Sehne mit nekrotischem Gewebe (Pfeil), sowie dichte inflammatorische Infiltrate beobachtet werden (Pfeilköpfe). Außerdem kam es zur Pannusformation (*), welcher aus Lymphozyten, Fibroblasten, Mastzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bestand und zur Zerstörung des Knochens führte.

Alle DBA/1 FcγRIIB^{-/-} Tiere entwickelten 9 Tage nach Immunisierung eine Arthritis deren Schweregrad bis Tag 15 schnell zunahm und dort und an Tag 18 einen maximalen mittleren Grad von $7,3 \pm 1,2$ erreichte. Dieser Wert lag deutlich über den gemessenen $5,8 \pm 0,7$ der Wildtyp DBA/1 Mäuse an Tag 15. Anschließend nahm die Arthritis langsam ab. An Tag 54 wurde noch ein mittlerer Schweregrad von $3,6 \pm 0,9$ gemessen. Die DBA/1 FcγRIIB^{-/-} Mäuse entwickelten eine Arthritis mit schwererem Verlauf und höherer Inzidenz als die Kontrollgruppe der Wildtyp DBA/1 Mäuse. Im Gegensatz dazu entwickelten die DBA/1 Mäuse, die defizient für die gemeinsame γ-Kette waren, eine Arthritis mit geringer Inzidenz und mildem klinischen Verlauf. Auch histologisch konnte der schwerste klinische Verlauf der DBA/1 FcγRIIB^{-/-} Mäuse beobachtet werden (Abb. 4.25). Der HE-Schnitt zeigt eine 100x Vergrößerung des Sprunggelenks einer hinteren Pfote dieser Tiere. Deutlich konnten massiven Infiltrationen inflammatorischer Zellen beobachtet werden, die stärker waren als in den Wildtyp DBA/1 Mäusen (Vergleiche Kap. 4.2.3). Die Infiltrationen in die synoviale Deckzellschicht führte zu einer Synovitis stärksten Grades mit starker Verdickung der Deckzellschicht. Die Inflammation betraf aber auch das umliegende Gewebe, insbesondere die Sehnen und Knochen. So war deutlich eine Infiltration der Sehne zu beobachten, die sogar zur Ruptur der Sehne führte (Pfeilköpfe). In der Vergrößerung dieses Ausschnittes (200x) konnte nekroti-

sches Gewebe um die gerissene Sehne herum beobachtet werden (Pfeil und Pfeilköpfe in der Vergrößerung). Daneben war eine Periostitis (*) der umliegenden Knochen und eine Periarthritis (O) zu beobachten. Die Vergrößerung des Ausschnittes zeigte auch die Formierung eines Pannus (*). Dieser Pannus bestand aus Fibroblasten, Lymphozyten, Mastzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten und führte zur vollständigen Zerstörung des Knochens.

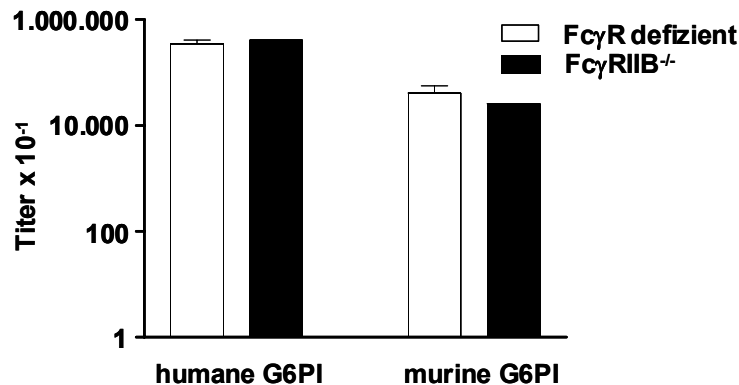


Abb. 4.26: Antikörpertiter gegen G6PI nach Arthritisinduktion in DBA/1 FcγRIIB^{-/-} und FcγR^{-/-} Mäusen. Je fünf DBA/1 FcγRIIB^{-/-} und FcγR^{-/-} Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. An Tag 21 wurde Serum gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von Antikörpern, die gegen rhG6PI und rmG6PI gerichtet waren, untersucht. Die höchste Serumverdünnung bei der anti-G6PI Antikörper noch detektierbar waren, wurde als Mittel ± SEM dargestellt.

Zusätzlich sollte die Antikörperentwicklung gegen G6PI im G6PI-induzierten Modell in den FcγRIIB^{-/-} DBA/1 Mäusen und in den gemeinsame γ-Kette defizienten DBA/1 Mäusen untersucht werden. An Tag 21 nach Immunisierung wurde Serum aus den Tieren gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern untersucht. Die DBA/1 Tiere, die defizient für die gemeinsame γ-Kette waren, entwickelten einen Antikörpertiter von 1:348.160 gegen rhG6PI und von 1:40.960 gegen rmG6PI. Die DBA/1 FcγRII^{-/-} Mäuse entwickelten einen Antikörpertiter von 1:409.600 gegen rhG6PI und von 1:25.600 gegen rmG6PI. Die Antikörpertiter lagen bei beiden Stämmen sowohl gegen humane G6PI als auch gegen murine G6PI in der gleichen Größenordnung. In beiden untersuchten Stämmen wurden weniger Antikörper gegen murine G6PI gebildet als gegen humane G6PI. Somit hatte es auf die Entwicklung von Antikörpern gegen G6PI keinen Einfluss, ob DBA/1 FcγRII^{-/-} oder DBA/1 Mäuse, die defizient für die gemeinsame γ-Kette waren, mit rhG6PI immunisiert wurden.

4.3.6 Die Rolle des Komplementfaktors C5 bei der Arthritisinduktion mit Glukose-6-phosphat Isomerase

Die Antikörperbindung an Antigene führt nicht nur zur Aktivierung akzessorischer Effektorzellen, die über Fc-Rezeptoren verfügen. Antikörper sind auch an der Schnittstelle zwischen adaptiver und angeborener Immunität bei der Aktivierung des klassischen Weges der Komplementkaskade beteiligt. Hier sollte untersucht werden, ob bei der G6PI-induzierten Arthritis in DBA/1 Mäusen das Komplementsystem für die Pathogenese wichtig ist. Durch Blockierung oder Depletion von C5, der zentralen Komponente der Komplementkaskade, kann die Komplementkaskade inhibiert werden. Hier wurde die Rolle des Komplements durch Depletion von C5 mit dem C5-depletierenden Antikörper BB5.1 untersucht. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. An den Tagen 6, 9 und 12 nach Immunisierung wurden die Tiere jeweils mit 750µg des Antikörpers BB5.1 durch i.p. Injektion behandelt. Der klinische Verlauf und die Inzidenz wurde über 30 Tage beobachtet (Abb. 4.27).

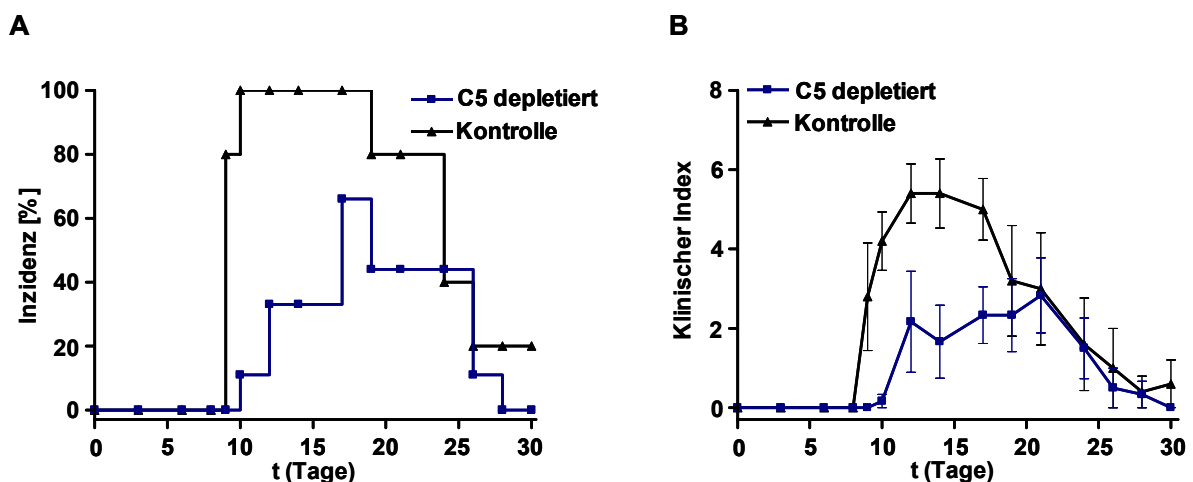


Abb. 4.27: Die Rolle des C5 Komplementfaktors in der G6PI-induzierten Arthritis. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. An Tag 6, 9 und 12 wurden 10 Tiere mit dem C5 depletierenden Antikörper BB5.1 durch i.p. Injektion behandelt (Quadrate). 5 Tiere blieben unbehandelt (Dreiecke). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen hinsichtlich der Inzidenz mit der die Arthritis auftrat (A) beobachtet. Die Tiere, die eine Arthritis entwickelten, gingen in den klinischen Verlauf ein (B). Gezeigt wurde der mittlere klinische Index \pm SEM.

Die Kontrolltiere entwickelten 9 Tage nach Immunisierung eine Arthritis. 80% aller unbehandelten DBA/1 Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt schon klinische Zeichen einer Arthritis (Abb. 4.27 A). Zwischen Tag 10 und Tag 17 litten alle Tiere unter einer Arthritis. Von Tag 19 an nahm die Inzidenz von 80% bis auf 20% an Tag 26 ab. Bei den behandelten Tieren waren an Tag 10 erst 11 % der Tiere krank. Auch danach entwickelte sich die Arthritis langsamer und mit geringerer Inzidenz als bei der Kontrollgruppe. Die Inzidenz stieg bis zum Tag 17 auf 66%, nahm dann zwei Tage später wieder auf 44% ab und fiel dann bis Tag 26 auf 11% ab. Von Tag 28 an zeigte keines der Tiere mehr klinische Zeichen einer Arthritis. Neben der

unterschiedlichen Inzidenz war auch der klinische Verlauf der erkrankten Tiere unterschiedlich (Abb. 4.27 B). Die Kontrollgruppe zeigte einen normalen Verlauf der Erkrankung und erreichte an Tag 12 einen maximalen mittleren Arthritisgrad von $5,4 \pm 0,7$. Anschließend nahm der mittlere Arthritisgrad beginnend von Tag 17 wieder kontinuierlich ab, bis an Tag 30 nur noch ein mittlerer Arthritisgrad von $0,6 \pm 0,6$ gemessen wurde. Bei den behandelten Tieren wurde erst an Tag 12 ein mittlerer Arthritisgrad von $2,2 \pm 1,3$ gemessen. Zwischen dem Tag 12 und 21 schwankte der mittlere Arthritisgrad zwischen $1,7 \pm 0,9$ an Tag 14 und $2,8 \pm 0,9$ an Tag 21. Anschließend nahm der mittlere Arthritisgrad kontinuierlich ab. An Tag 30 zeigte keines der Tiere mehr klinische Zeichen einer Arthritis. Aufgrund der Behandlung mit dem Antikörper BB5.1 erkrankten weniger Tiere und die Arthritis verlief milder.

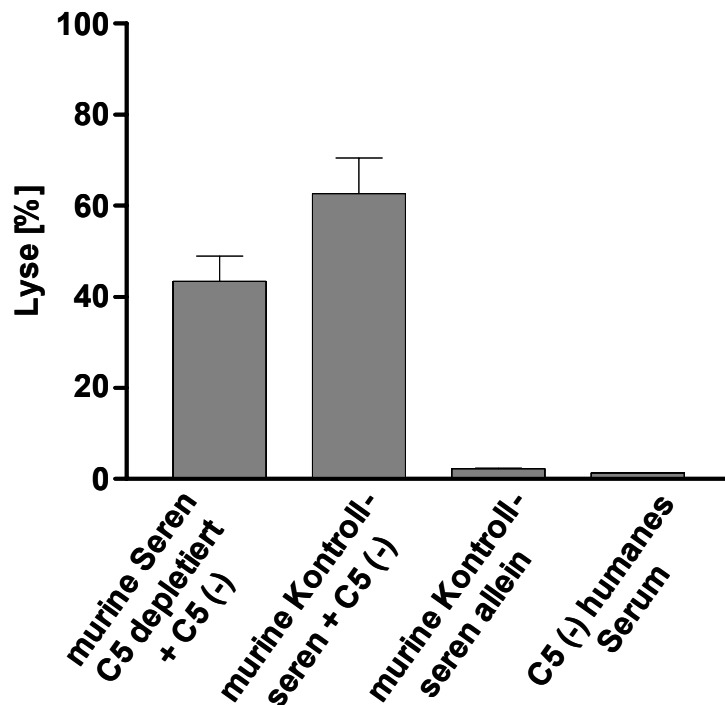


Abb. 4.28: Komplementaktivität nach Depletion von C5 in DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. Das Komplementprotein C5 wurde durch i.p. Injektion von 750 µg des Antikörpers BB5.1 an den Tagen 6, 9 und 12 depletiert. Das Serum dieser Tiere und von unbehandelten Kontrolltieren wurde an Tag 14 nach Immunisierung gewonnen. Sensitivierte Schafserthrozyten wurden mit dem gewonnenen Serum zusammen mit einem C5-defizientem humanen Serum inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Erythrozyten nur mit den murinen Kontrollseren oder nur mit dem C5 defizientem Serum inkubiert. Das durch die Lyse freigesetzte Hämoglobin wurde photometrisch vermessen und daraus die mittlere % Lyse \pm SEM bestimmt. Die Werte setzten sich aus 10 Tieren, die behandelt wurden, und drei Kontrolltieren zusammen.

Die Effizienz der Blockade des Komplementsystems wurde über die Fähigkeit des Serums zur Hämolyse kontrolliert. Sensitivierte Schafserthrozyten wurden mit dem Serum der behandelten oder der Kontrolltiere in Anwesenheit von C5 freiem humanen Serum inkubiert und die Lyse der Erythrozyten über das freigesetzte Hämoglobin photometrisch vermessen (Abb.

4.30). Mausserum ist ohne zusätzliches humanes Serum nicht in der Lage, Erythrozyten zu lysieren. Das C5 freie humane Serum alleine konnte nur 1,3 % der Erythrozyten lysieren. Auch die Kontrollseren der unbehandelten Tiere konnten ohne C5 freiem Serum nur $2,2 \pm 0,2$ % der Erythrozyten lysieren. Wurden die Kontrollseren zusammen mit dem C5 freiem Serum mit sensitivierten Schafserothrozyten inkubiert, wurden $62,7 \pm 7,8$ % der Erythrozyten lysiert. Eine verminderte lytische Aktivität zeigten die aus behandelten Mäusen gewonnen Seren auf. Hier konnte nur noch eine Lyse von $43,4 \pm 5,6$ % gemessen werden. Das entsprach einer durchschnittlichen Reduktion der Komplementaktivität von ungefähr 30 %. Obwohl die Komplementaktivität nicht vollständig blockiert wurde, wurde durch die Behandlung der Tiere mit dem C5 depletierenden Antikörper BB5.1 die Inzidenz und vor allem auch der Verlauf der Arthritis deutlich beeinflusst.

4.4 Die Rolle der T-Zellen und Zytokine in der G6PI-induzierten Arthritis

4.4.1 Zelluläre Antwort auf Glukose-6-phosphat Isomerase nach Immunisierung

Nach Immunisierung mit rhG6PI entwickelten nur Mäuse vom DBA/1 Stamm eine Arthritis. In allen anderen Stämmen mit Ausnahme des DBA/1 DR4-Kim Stammes, wo eines von elf Tieren eine Arthritis entwickelte, wurden kein Tier nach Immunisierung krank. Hier sollte untersucht werden, ob die Zellen aus den drainierenden Lymphknoten nach Immunisierung mit rhG6PI restimuliert werden konnten und nach Erkennung der präsentierten G6PI proliferieren. Dabei sollte die Proliferation zwischen dem suszeptiblen DBA/1 Stamm und den nicht-suszeptiblen Stämmen verglichen werden. Mäuse unterschiedlicher Stämme wurden mit rhG6PI immunisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Einzelzellsuspension aus den inguinalen Lymphknoten hergestellt. Diese wurden mit rhG6PI restimuliert und die Proliferation über den ^3H -Thymidineinbau gemessen. Der Stimulationsindex berechnete sich dabei aus dem Quotienten der Werte mit rhG6PI restimulierten Zellen und der unstimulierten Zellen. Sechs Tage nach der Arthritisinduktion wurde in den DBA/1 Mäusen (Abb. 4.29 A) eine erste zelluläre Antwort gegen G6PI gemessen. An den Tagen 9 und 12 erreichte die zelluläre Antwort gegen G6PI ihren Höhepunkt mit einem mittleren Stimulationsindex von $7,3 \pm 0,2$. Anschließend nahm die zelluläre Antwort gegen G6PI rapide ab und erreichte an Tag 18 einen mittleren Stimulationsindex von $2,2 \pm 0,2$. Bei keinem der anderen untersuchten Stämme wurde zu irgendeinem Zeitpunkt ein Stimulationsindex $> 3,2$ gemessen (Abb. 4.29 B).

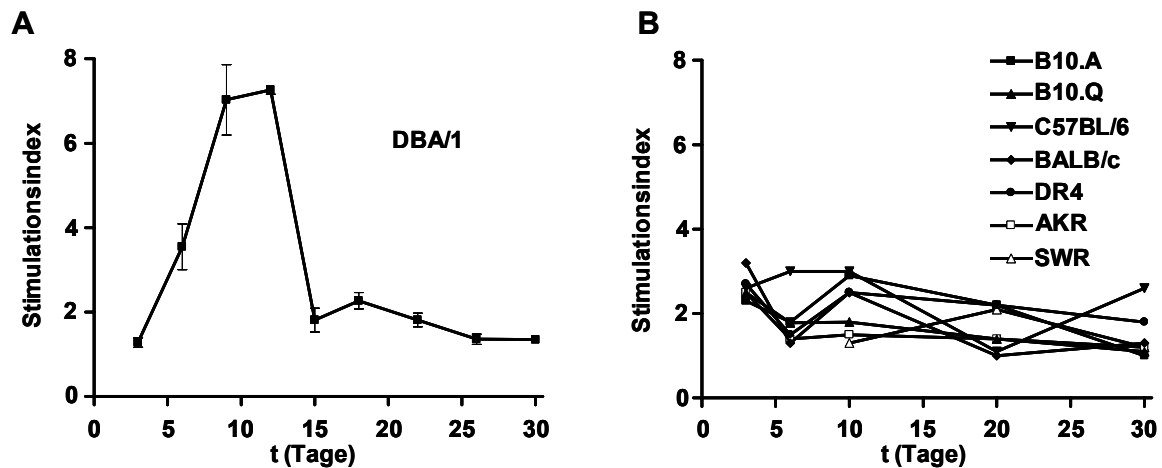


Abb. 4.29: Poliferation von Zellen der inguinalen Lymphknoten nach Restimulation mit rhG6PI. Zellen der inguinalen Lymphknoten von DBA/1 Mäusen (A) oder anderer nicht-suszeptibler Mausstämmen (B) wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach Immunisierung mit rhG6PI für 72h in 96 Muldenplatten kultiviert. Die Zellen blieben unstimuliert oder wurden mit 10µg/ml rhG6PI restimuliert. In den letzten 16h der Kultur wurde 1µCi ^3H -Thymidin zugegeben. Die Proliferation wurde am β -Szintillationszähler gemessen. Der Stimulationindex war dabei der Quotient aus den Werten, die für rhG6PI restimulierte Zellen gemessen wurden und den Werten, die für die unstimulierten Zellen gemessen wurde. Der Stimulationindex wurde als Mittel \pm SEM angegeben. Zu jedem Zeitpunkt wurden 3 DBA/1 Mäuse bzw. 2 Mäuse anderer Stämme benutzt.

Insgesamt schwankten die gemessenen Stimationsindices bei den unterschiedlichen Stämmen zwischen 1,5 und 2,5. Die DBA/1 Mäuse zeigten eine schwache, wenn auch deutliche zelluläre Antwort nach Restimulation mit rhG6PI, während die nicht-suszeptiblen Stämme, wie B10.Q, B10.A, AKR, BALB/c, SWR, DR4mix und C57BL/6, keine bzw. gerade detektierbare Antwort zeigten.

4.4.2 Messung der Proliferation der T-Lymphozyten mit CFDA-SE

Die in 4.4.1 dargestellte Proliferation von Zellen aus den inguinalen Lymphknoten ließ keinen Schluss zu, welche Subpopulation von Lymphozyten nach Restimulation mit rhG6PI zur Proliferation angeregt wurde. Da für die weiteren Untersuchungen entscheidend war, ob CD4 T-Lymphozyten an der Pathogenese beteiligt waren, sollte hier untersucht werden, ob CD4 T-Zellen nach Restimulation mit rhG6PI aktiviert wurden und proliferierten.

DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI in CFA oder mit PBS in CFA immunisiert. An Tag 11 wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und mit CFDA-SE markiert, um die Proliferation am Durchflussszytometer zu verfolgen. Anschließend wurden die Zellen für 72h mit rhG6PI oder rmG6PI restimuliert und dann im FACS gegen CD4 vermessen.

Nach Immunisierung mit PBS in CFA proliferierten nur maximal 0,05% der CD4 T-Lymphozyten nach Restimulation mit rhG6PI oder rmG6PI bzw. ohne Zugabe von Antigen

(Abb. 4.30). Dies zeigte klar, dass das CFA der Immunisierung und die rhG6PI bzw. rmG6PI alleine keinen Effekt auf die Proliferation von CD4 T-Lymphozyten in der Kultur hatten.

Nach Immunisierung mit rhG6PI proliferierten 0,73% der CD4 T-Lymphozyten spontan ohne Zugabe eines Antigens. Bei Restimulation mit rhG6PI bzw. rmG6PI proliferierten 1,02% bzw. 0,84% der CD4⁺ Zellen. Nach Restimulation mit rhG6PI oder rmG6PI nahm die Zahl der CD4 T-Lymphozyten, die proliferierten, zu, wobei der Effekt nach Restimulation mit rhG6PI deutlicher war als nach Restimulation mit rmG6PI. Die CD4 T-Lymphozyten zeigten eine spezifische, zugleich aber auch schwache Antwort auf das Antigen mit dem die Tiere immunisiert wurden.

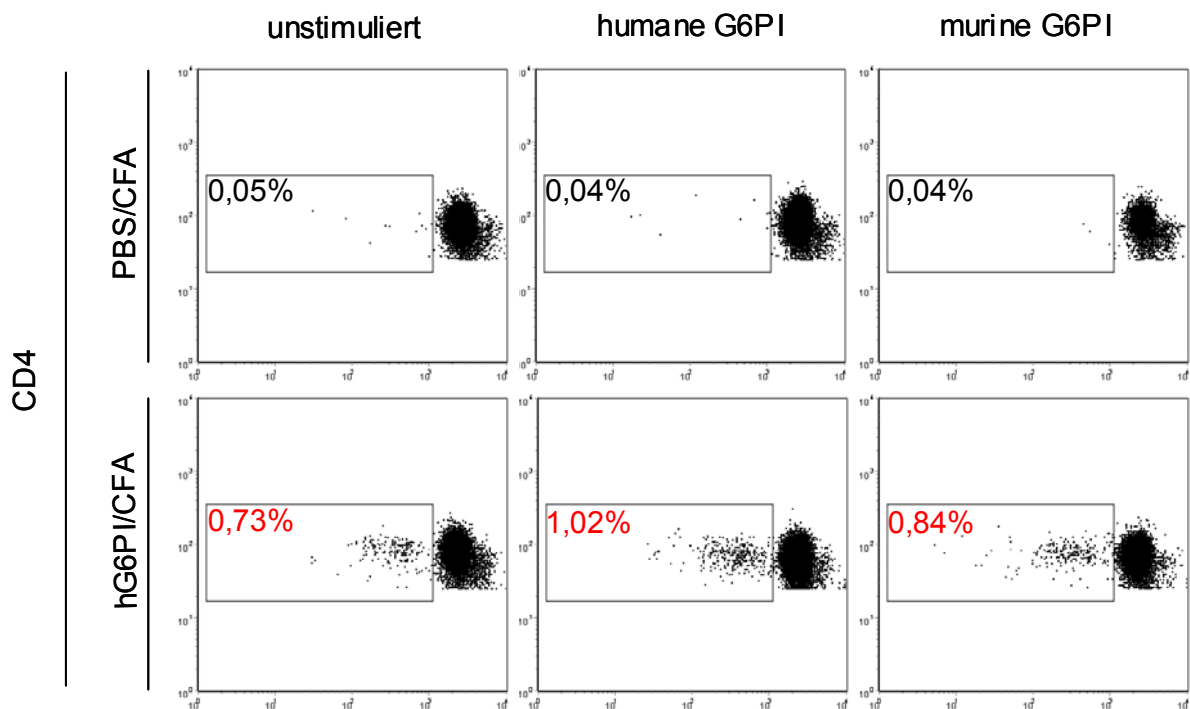


Abb. 4.30: Proliferation der CD4 T-Lymphozyten nach Restimulation mit rhG6PI. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI/CFA oder mit PBS/CFA immunisiert. An Tag 11 nach Immunisierung wurden die inguinalen Lymphknoten entnommen und die Zellen mit CFDA-SE markiert. Anschließend wurden die Zellen mit rhG6PI oder rmG6PI restimuliert bzw. blieben unstimuliert. Danach wurden die Zellen gegen CD4 gefärbt, im FACS analysiert und über die Abnahme der CFDA-SE-Intensität die Proliferation bestimmt. Dargestellt ist exemplarisch eine Messung für 1 von 3 Tieren zu diesem Zeitpunkt.

4.4.3 Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen nach Restimulation mit Glukose-6-phosphat Isomerase

Eine wichtige Funktion der CD4 T-Lymphozyten ist die Sezernierung von Zytokinen. Mit Hilfe dieser Zytokine werden unterschiedliche Effektormechanismen initiiert. Daher wurden DBA/1 Mäuse mit rhG6PI immunisiert und an den Tagen 6, 9 oder 11 die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Zellen der Milz und der inguinalen Lymphknoten wur-

den mit rhG6PI für 6h restimuliert. Anschließend wurden die Zellen CD4 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen Zytokine gefärbt. Dabei wurde die Produktion der Zytokine IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10 und IL-6 untersucht. Die Spezifität der Färbungen wurde mit unspezifischen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Isotypantikörpern kontrolliert.

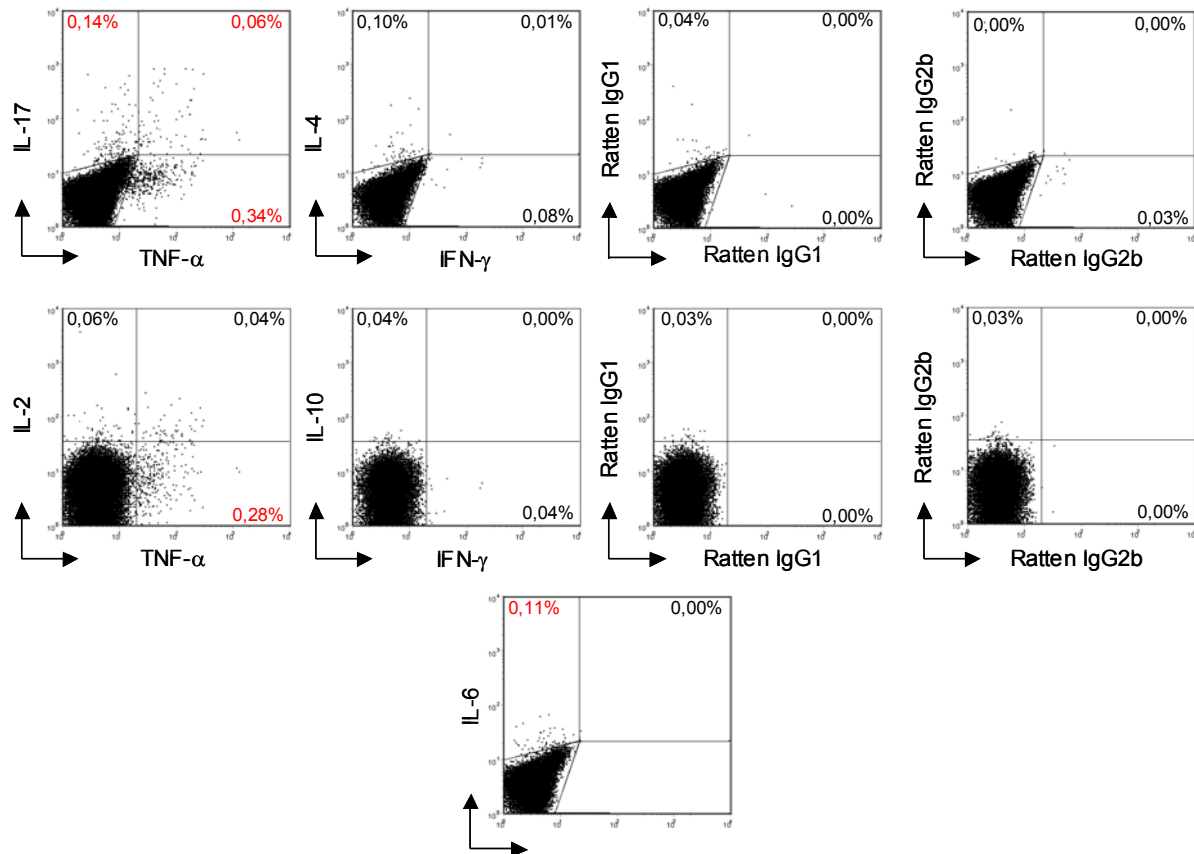


Abb. 4.31: CD4⁺ Zellen exprimieren TNF- α , IL-6 und IL-17 nach Restimulation mit rhG6PI. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. 11 Tage später wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Zellen wurden für 6h mit rhG6PI restimuliert, anschließend CD4 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α gefärbt. Die Spezifität der Färbungen wurde mittels Isotypantikörper kontrolliert. Die Frequenz der positiven Zellen in den Quadranten ist in % der CD4⁺ Zellen angegeben. Gezeigt wird die repräsentative Färbung der inguinalen Lymphknoten einer von drei Mäusen an Tag 11.

Abb. 4.31 zeigt eine repräsentative Messung einer Färbung von inguinalen Lymphknotenzellen an Tag 11. Die Messung der Zytokine war spezifisch, da die Isotypantikörper nicht unspezifisch in den Zellen banden. Die Zellen produzierten nach Restimulation mit rhG6PI kein IL-10 und kein IL-2. Unter 0,1% der CD4⁺ Zellen produzierten IFN- γ und IL-4 nach Abzug der Isotypkontrollen. TNF- α dagegen wurde von 0,3% bis 0,4% der CD4⁺ Zellen exprimiert. Auch IL-17 wurde von 0,16% und IL-6 von 0,1% der CD4⁺ Zellen exprimiert. Damit wurden vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-17 und IL-6 sekretiert. Neben Tag 11 wurde die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen auch an den Tagen 6 und 9 untersucht (Abb. 4.32). An diesen Tagen wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen und nach oben beschriebem Verfahren durchflusszytometrisch auf die Produktion von Zy-

tokinen untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittel \pm SEM der Zytokinproduktion der drei an dem jeweiligen Tag untersuchten Tiere. In den inguinalen Lymphknoten war an allen drei untersuchten Tagen TNF- α das am stärksten exprimierte Zytokin. Die Frequenz unter den CD4⁺ Zellen schwankte dabei zwischen 0,40% an Tag 11 und 0,36% und Tag 6.

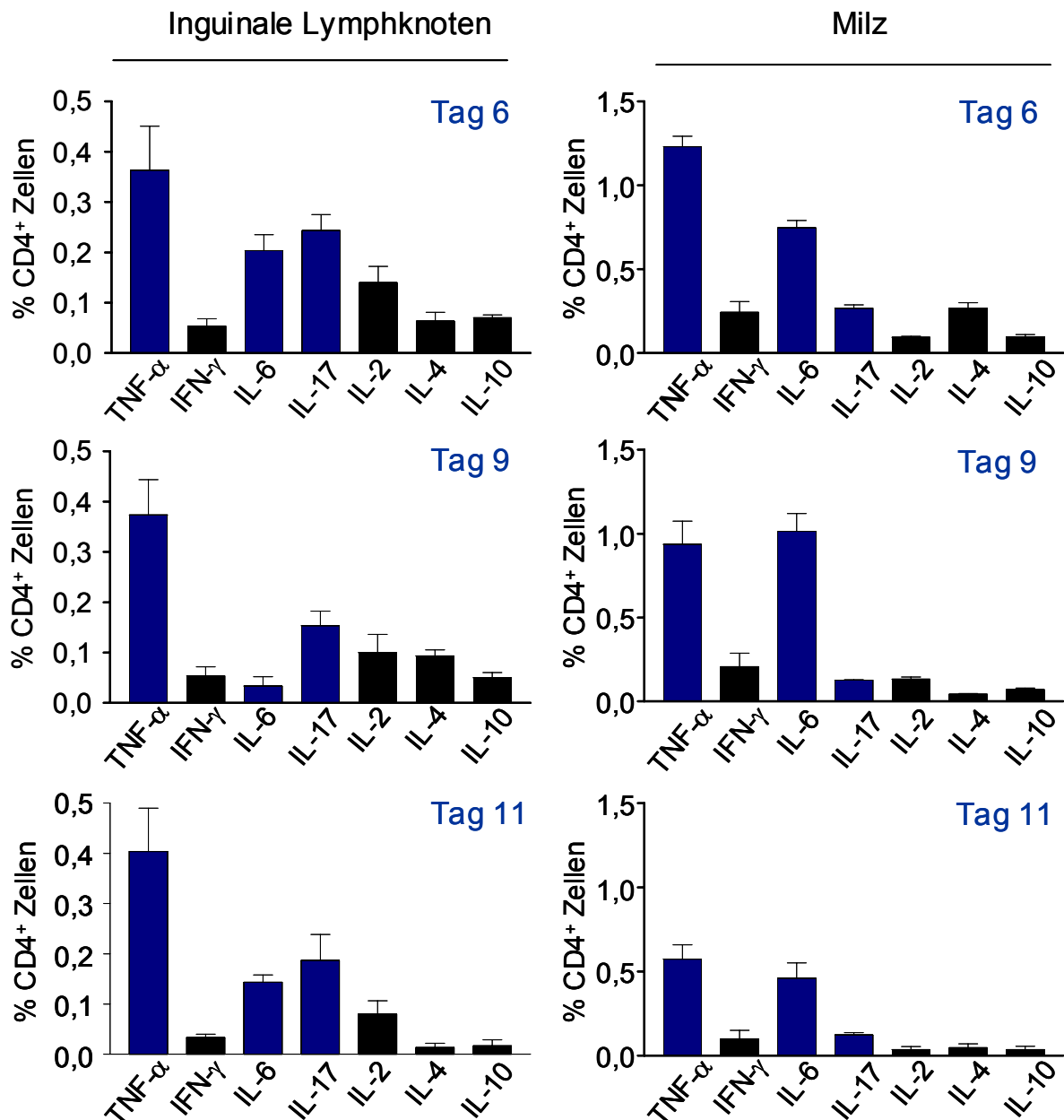


Abb. 4.32: Zytokinexpression von CD4⁺ Zellen nach Restimulation mit rhG6PI. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. 6, 9 und 11 Tage später wurden die Milz und die inguinalen Lymphknoten entnommen. Die Zellen wurden mit rhG6PI restimuliert, anschließend CD4 gefärbt, fixiert und intrazellulär gegen IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α gefärbt. Dargestellt wurden die Ergebnisse von 3 Tieren pro Zeitpunkt als Mittel der Zytokinproduktion der CD4⁺-Zellen \pm SEM.

Daneben wurde vor allem IL-17 produziert. An Tag 6 exprimierten 0,24% der CD4⁺ Zellen IL-17. Diese Frequenz nahm dann etwas ab und schwankte zwischen 0,15% und 0,18% an den Tagen 9 und 11. Auch IL-6 wurde verstärkt produziert. Dabei schwankte die Produktion

in den CD4⁺ Zellen an den unterschiedlichen Tagen erheblich. Produzierten an Tag 6 noch im Mittel 0,20% der CD4⁺ Zellen IL-6 und an Tag 11 noch 0,14%, so war an Tag 9 mit 0,03% kein IL-6 detektierbar. Bei allen anderen Zytokinen, die in den CD4⁺ Zellen der inguinalen Lymphknoten untersucht wurden, lag die Frequenz der Zytokinproduzenten immer unter 0,1% mit Ausnahme von IL-2 an Tag 6, wo 0,14% der CD4⁺ Zellen IL-2 produzierten.

Ein ähnliches Bild zeigten die CD4⁺ Zellen der Milz. Auch hier war TNF- α das vorherrschende Zytokin. Die Frequenz lag sogar noch deutlich über der Frequenz in den inguinalen Lymphknoten. An Tag 6 produzierten 1,23% der CD4⁺ Zellen TNF- α . Die Frequenz nahm dann kontinuierlich ab, so dass an Tag 9 nur noch 0,94% und an Tag 11 0,57% der CD4⁺ Zellen TNF- α sezernierten. Auch IL-6 wurde in den CD4⁺ Zellen der Milz zu allen Zeitpunkten exprimiert. An Tag 6 lag die Frequenz bei 0,75%, stieg dann bis Tag 9 auf 1,01% an und fiel schließlich an Tag 11 auf 0,46% ab. Wie in den inguinalen Lymphknoten wurde auch IL-17 gemessen. Die Frequenz der IL-17 exprimierenden CD4⁺ Zellen schwankte zwischen 0,27% an Tag 6 und 0,12% an Tag 11. Im Gegensatz zu den inguinalen Lymphknoten exprimierten die CD4⁺ Zellen in der Milz an den Tagen 6 und 9 auch INF- γ mit Frequenzen > 0,20%. IL-10 konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. IL-4 wurde nur an Tag 6 mit einer Frequenz von 0,26% der CD4⁺ Zellen exprimiert. Auch IL-2 war nur an Tag 9 mit einer Frequenz von 0,13% detektierbar. TNF- α , IL-17 und IL-6 waren die vorherrschenden Zytokine, die nach Restimulation von Milz und Lymphknotenkulturen mit rhG6PI exprimiert wurden. Dabei war die Expression der Zytokine in der Milz im Durchschnitt höher als in den inguinalen Lymphknoten.

4.4.4 Prävention der G6PI-induzierten Arthritis durch TNF-Blockade

CD4⁺ Zellen der rhG6PI immunisierten DBA/1 Mäuse produzierten nach Restimulation mit rhG6PI vor allem TNF- α . Hier sollte untersucht werden, ob TNF- α an der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt ist. Die Funktion des TNF- α sollte mit Hilfe eines löslichen dimeren Rezeptors des TNF- α , dem sTNFR-p75-IgG-Fc (Etanercept), der mit dem Fc-Teil des humanen IgG₁ fusioniert wurde, blockiert werden. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert und wurden täglich bis Tag 9 und anschließend jeden dritten Tag mit 100 μ g Etanercept in PBS i.p. behandelt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. 17 der 20 (85%) unbehandelten Tiere erkrankten schon 10 Tage nach Immunisierung (Abb. 4.33 A). Bis zum Tag 19 schwankte die Inzidenz der Arthritis zwischen 70% und 85% und nahm erst dann langsam kontinuierlich ab, bis an Tag 30 nur noch 35% der Kontrolltiere Zeichen einer Arthritis zeigten. Dagegen entwickelten nur 30% der mit Etanercept behandel-

ten Tiere überhaupt eine Arthritis. Die Entwicklung der Arthritis erfolgte ungefähr eine Woche verzögert im Gegensatz zu den Kontrolltieren, da erst an Tag 16 30% der Tiere krank waren. Die Anzahl der Tiere mit klinischen Zeichen einer Arthritis änderte sich bis Tag 23 nicht deutlich und schwankte zwischen fünf und sechs. Erst von Tag 26 an zeigten nur noch vier Tiere klinische Zeichen einer Arthritis. Die Kontrollgruppe zeigte erste klinische Zeichen einer Arthritis nach 9 Tagen und erreichte an Tag 14 einen maximalen mittleren Arthritisgrad von $5,9 \pm 0,5$ (Abb. 4.33 B). Anschließend nahm der Schweregrad der Arthritis kontinuierlich ab.

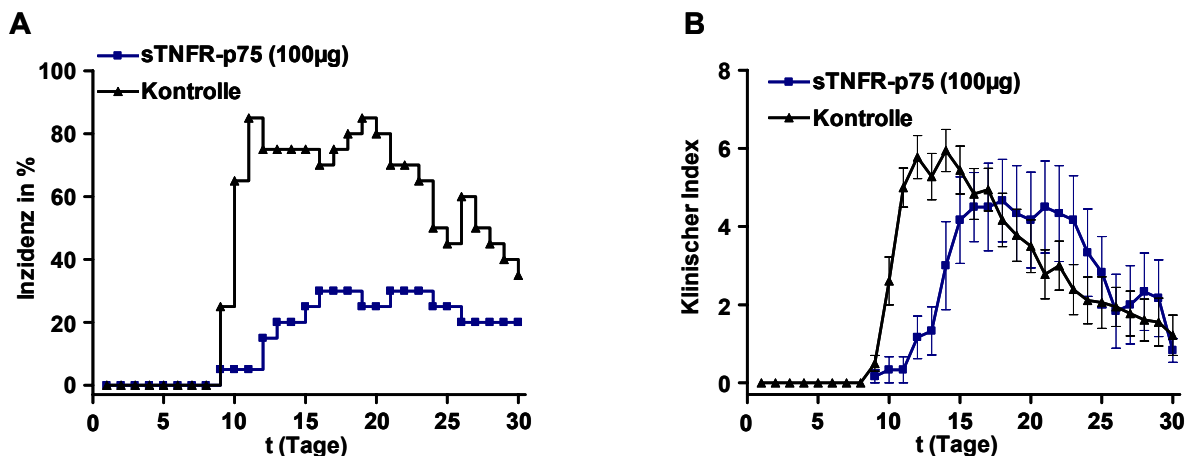


Abb. 4.33: Prävention der G6PI-induzierten Arthritis durch TNF-Blockade. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. 20 DBA/1 wurden mit 100µg des dimeren löslichen TNF-Rezeptors p75, der mit dem Fc-teil des humanen IgG₁ fusioniert wurde, behandelt (Etanercept). Die Behandlung erfolgte an den Tagen 0 bis 9 täglich und anschließend jeden dritten Tag. Die Entwicklung der Arthritis wurde über 30 Tage verfolgt (A + B). Etanercept behandelte Tiere entwickelten eine Arthritis mit einer Inzidenz von 30% (6/20) (Quadrate) (A). Dagegen erkrankten 85% der Kontrolltiere (17/20) (Dreiecke). Die erkrankten, mit Etanercept behandelten Tiere zeigten eine verzögerte Entwicklung der Arthritis (B) (Quadrate) mit einem geringeren maximalen mittleren Arthritisgrad als die erkrankten Kontrolltiere (Dreiecke). In dem klinischen Verlauf wurden nur die Tiere berücksichtigt, die eine Arthritis entwickelten und diese wurden als Mittel \pm SEM dargestellt.

Die erkrankten, mit sTNFR-p75 behandelten Tiere zeigten ein anderes Bild. Zwar entwickelte auch hier schon an Tag 9 eine Maus eine Arthritis. Insgesamt trat die klinische Entwicklung der Arthritis verzögert ein. Erst an Tag 18 erreichten die behandelten Tiere einen maximalen mittleren Arthritisgrad von $4,6 \pm 1,0$. Dieser Arthritisgrad war zwar deutlich geringer als der maximale mittlere Arthritisgrad der Kontrollmäuse an Tag 14, aufgrund der geringen Zahl der erkrankten, behandelten Tiere aber nicht signifikant ($P > 0,05$). Weiterhin wurde die Dosisabhängigkeit der Etanercept Behandlung bei der G6PI-induzierten Arthritis untersucht. Dazu wurden wie oben beschrieben Mäuse mit rhG6PI immunisiert und mit 30µg Etanercept täglich bis Tag 25 behandelt. Alle Kontrolltiere entwickelten schon 10 Tage nach Immunisierung eine Arthritis (Abb. 4.34 A). Bis zum Tag 21 zeigten immer noch 88% der Tiere klinische Zeichen einer Erkrankung. In diesem Experiment konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum noch eine Inzidenz der Arthritis von 63% der Tieren beobachtet werden. Die mit

30µg Etanercept behandelten Tiere entwickelten, ähnlich wie Mäuse, die mit 100µg behandelt wurden, eine verzögerte Arthritis. Beginnend von Tag 10 entwickelten erst an Tag 18 67% der Tiere eine Arthritis. Anschließend nahm die Inzidenz der Arthritis stetig ab und erreichte von Tag 24 an eine Inzidenz, die zwischen 20% und 26% schwankte. Der klinische Verlauf der Kontrolltiere entsprach den schon zuvor beschriebenen Verläufen. Beginnend von Tag 9 erreichten die Tiere einen maximalen mittleren Arthritisgrad von $6,5 \pm 1,0$ an Tag 14, der dann langsam auf $3,5 \pm 1,0$ an Tag 30 abnahm. Der klinische Verlauf der mit 30µg Etanercept behandelten Tiere reflektierte die verzögerte Entwicklung der Arthritis. Beginnend von Tag 10 an nahm der mittlere Arthritisgrad nur langsam zu und erreichte an Tag 18 mit $3,1 \pm 0,7$ sein Maximum. Der Unterschied zwischen dem maximalem mittleren Arthritisgrad der Kontrolltiere und der behandelten Tiere ist signifikant (Mann Whitney-Test : $P < 0,05$). Nach Tag 18 nahm der klinische Schweregrad der Arthritis wieder langsam ab und erreichte an Tag 30 einen Wert von $1,1 \pm 0,5$. Auch die Behandlung mit 30µg Etanercept war wirksam. Im Gegensatz zu der Behandlung mit 100µg war die präventive Wirkung jedoch viel geringer, da 67% der mit 30µg behandelten erkrankten anstatt 30% der mit 100µg behandelten. Bei beiden Dosen trat die Arthritis um eine Woche verzögert ein. Zumindest bei der Behandlung mit 30µg war der Verlauf der Arthritis signifikant milder als bei den Kontrolltieren. Bei Behandlung mit 100µg konnte aufgrund der geringen Tierzahl kein signifikanter Unterschied beim maximalen mittleren Arthritisgrad festgestellt werden.

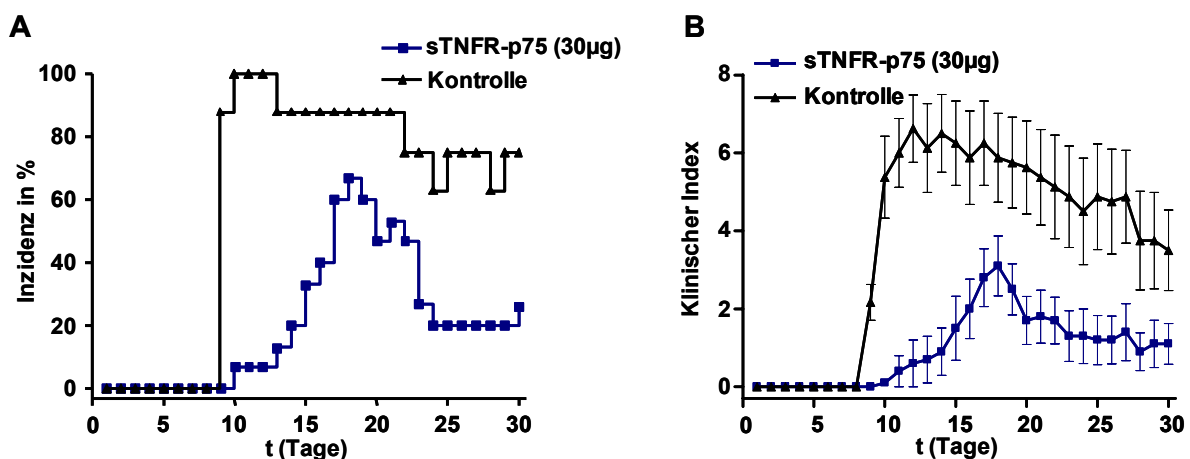


Abb.4.34: Prävention der G6PI-induzierten Arthritis mit einer geringen Dosis Etanercept. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. 15 DBA/1 wurden mit 30µg des dimeren löslichen TNF-Rezeptors p75 behandelt. Die Behandlung erfolgte täglich bis Tag 25 nach Immunisierung. Die Entwicklung der Arthritis wurde über 30 Tage verfolgt (A + B). Etanercept behandelte Tiere entwickelten eine Arthritis mit einer Inzidenz von 67% (10/15) (A, Quadrate). Dagegen erkrankten 100% (8/8) der Kontrolltiere (Dreiecke). Die erkrankten, mit Etanercept behandelten Tiere zeigten eine verzögerte Entwicklung der Arthritis (B, Quadrate) mit einem geringeren maximalen mittleren Arthritisgrad als die erkrankten Kontrolltiere (Dreiecke). In dem klinischen Verlauf wurden nur die Tiere berücksichtigt, die eine Arthritis entwickelten und wurden als Mittel \pm SEM dargestellt.

4.4.5 Therapie der G6PI-induzierten Arthritis durch TNF-Blockade

Die Behandlung mit 100µg Etanercept nach Immunisierung mit rhG6PI wirkte in den meisten Tieren präventiv auf die Entwicklung einer Arthritis. Hier sollte untersucht werden, ob Etanercept auch therapeutisch bei Tieren wirkt, die schon eine Arthritis entwickelt hatten. 16 DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. Von Tag 11 bis Tag 23 wurden 10 Tiere täglich mit 100µg Etanercept i.p. behandelt. Die anderen Tiere dienten zur Kontrolle. Die Inzidenz und der klinische Verlauf wurden über 30 Tage beobachtet.

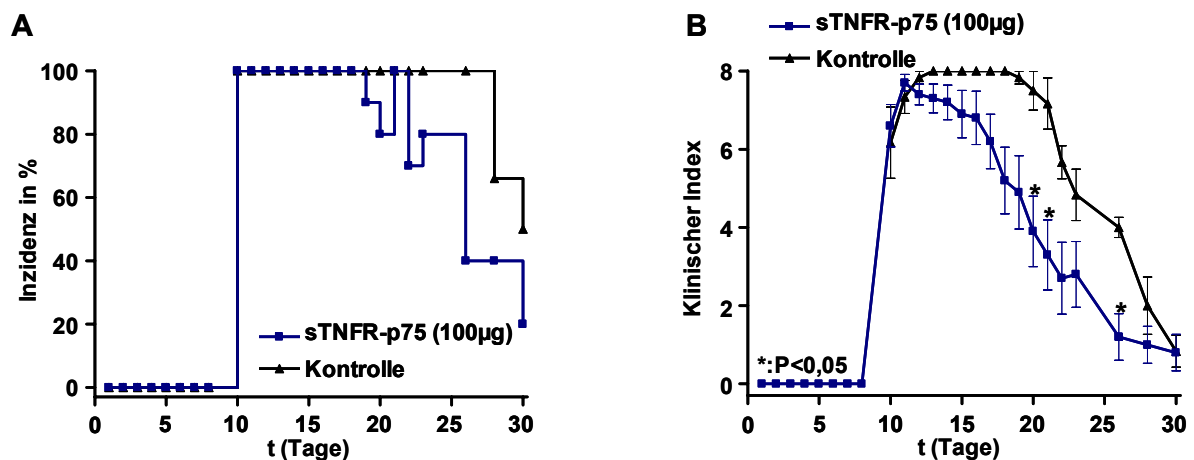


Abb. 4.35: Therapie einer entwickelten Arthritis nach G6PI Immunisierung mit Etanercept. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert, um eine Arthritis zu induzieren. 10 DBA/1 Mäuse wurden mit 100µg des dimeren löslichen TNF-Rezeptors p75 behandelt. Die Behandlung erfolgte täglich von Tag 11 bis Tag 23 nach Immunisierung. Die Entwicklung der Arthritis wurde über 30 Tage verfolgt (A + B). Etanercept behandelte Tiere (A, blaue gefüllte Quadrate) und die 6 Kontrolltiere (A, schwarze gefüllte Dreiecke) entwickelten eine Arthritis mit einer Inzidenz von 100%. In dem klinischen Verlauf (B) wurden der klinische Index als Mittel \pm SEM dargestellt.

Alle Tiere entwickelten nach 10 Tagen eine Arthritis (Abb. 4.35 A). Bei den Kontrolltieren konnten bis Tag 26 bei allen Tieren klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet werden. Erst ab Tag 28 nahm die Inzidenz bis auf 50 % an Tag 30 ab. Bei den mit Etanercept behandelten Tieren schwankte die Inzidenz zwischen Tag 19 und Tag 21 zwischen 100 und 80 %. Von Tag 22 an nahm die Inzidenz dann bis auf 20 % an Tag 30 langsam ab. Der klinische Verlauf zwischen beiden Gruppen war ähnlich (Abb. 4.35 B). An Tag 11 erreichten die mit Etanercept behandelten Tieren einen maximalen mittleren Arthritisgrad von $7,7 \pm 0,2$. An diesem Tag wurde mit der Etanerceptbehandlung begonnen. Anschließend nahm der Grad der Arthritis langsam ab. Trotz Behandlung konnte an Tag 17 noch ein mittlerer Grad der Arthritis von $6,2 \pm 0,7$ gemessen werden. Erst von Tag 22 an lag der Arthritisgrad unter 3 und erreichte an Tag 30 schließlich einen Grad von $0,8 \pm 0,5$. Die Kontrolltiere erreichten an Tag 13 ihren maxima-

len Grad der Arthritis von $8,0 \pm 0,0$. Bis Tag 18 blieb dieser maximale Grad der Arthritis erhalten und nahm dann erst von Tag 19 an langsam ab. An Tag 23 betrug der mittlere Arthritisgrad noch $4,8 \pm 0,7$ und sank bis Tag 30 auf $0,8 \pm 0,4$. Bis auf die Tage 20, 21 und 26 ist der klinische Verlauf nicht signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-Test : $P < 0,05$). Die therapeutische Behandlung mit Etanercept zeigt keine Veränderung in der Inzidenz und im klinischen Verlauf in der G6PI-induzierten Arthritis im Vergleich mit unbehandelten Tieren.

4.4.6 CD4⁺ Zelldepletion in der Induktionsphase der G6PI-induzierten Arthritis

In den Kapiteln 4.4.1 bis 4.4.3 wurde gezeigt, dass sich CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit rhG6PI spezifisch restimulieren lassen und mit der Sekretion von TNF- α , IL-17 und IL-6 antworten. Das von den CD4⁺ T-Zellen und anderen Zellen produzierte TNF- α war kritisch für die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis. Hier sollte untersucht werden, ob CD4⁺ T-Zellen für die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis essentiell sind. Die CD4⁺ T-Zellen sollten zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der klinischen Manifestation der Arthritis depletiert werden.

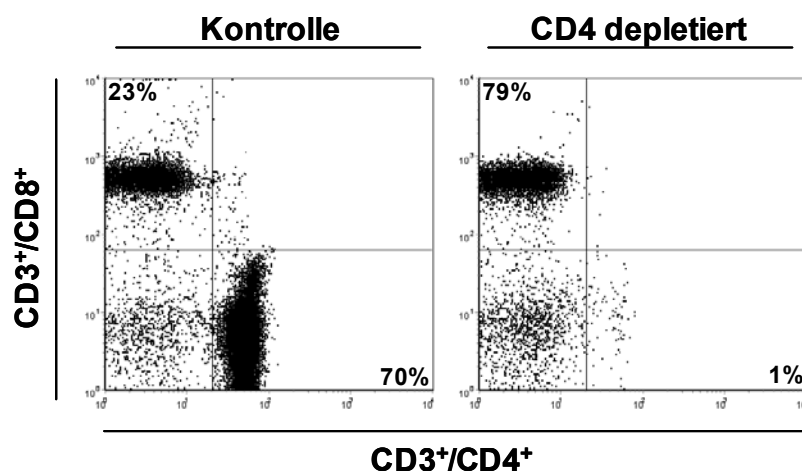


Abb. 4.36: Effizienz der CD4-Depletion. DBA/1 Mäusen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten 300 μ g des depletierenden Ratte-anti-Maus-CD4 Antikörpers YTS191.1 i.p. injiziert. Zur Kontrolle der Depletion wurde den Mäusen vier Tage nach der letzten Injektion Blut entnommen und gegen CD3, CD4 und CD8 gefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt ist die CD4 und CD8 Expression nachdem nur die lebenden CD3⁺ Lymphozyten angezeigt wurden. Im linken Teil der Abbildung ist die CD4 und CD8 Expression der CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut naiver DBA/1 Mäuse gezeigt. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die CD4 und CD8 Expression der CD3⁺ T-Zellen im peripheren Blut vier Tage nach der letzten Injektion des Antikörpers YTS191.1.

Die Depletion erfolgte mit dem depletierenden Ratte-anti-Maus CD4 Antikörper, YTS191.1. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden den DBA/1 Mäusen 300 μ g dieses Antikörper i.p. injiziert. Die Effizienz der Depletion lag bei über 90 % (Abb. 4.36). Blut einer naiven DBA/1

Maus wurde gegen CD3, CD4 und CD8 gefärbt und im FACS analysiert. Die Population der CD3⁺ Lymphozyten teilte sich zu 23 % in CD8 exprimierende T-Lymphozyten und zu 70 % in CD4 exprimierende T-Lymphozyten auf. 4 Tage nach der letzten Injektion des depletierenden Antikörpers YTS191.1 war die CD4⁺ Population bis auf 1 % reduziert, während die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen auf 79% anstieg. Die CD4⁺ Lymphozyten wurden zu einem sehr frühen Zeitpunkt (Tag -3, 0, 5), mittleren Zeitpunkt (Tag 6 und 9) und zu einem späten Zeitpunkt (Tag 8 und 11) der Induktionsphase depletiert.

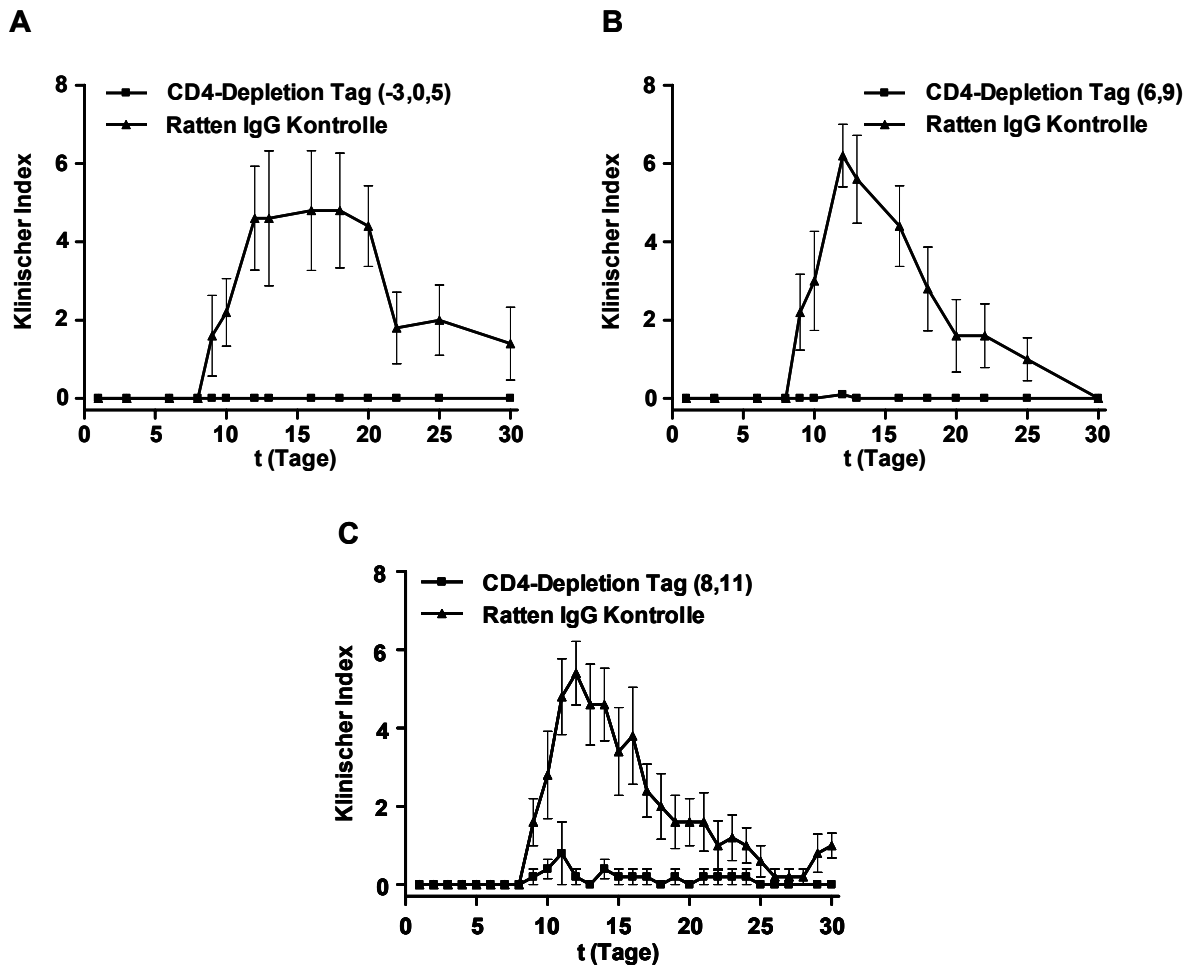


Abb. 4.37: CD4⁺ Zelldepletion in der Induktionsphase verhindert die G6PI-induzierte Arthritis. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert und der klinische Verlauf der Arthritis über 30 Tage beobachtet. Die CD4⁺ Lymphozyten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor oder nach Immunisierung mit dem depletierenden Ratte-anti-Maus-CD4 Antikörper YTS191.1 durch i.p. Injektion depletiert (Quadrate). Die Kontrolltiere erhielten zu den gleichen Zeitpunkten polyklonales Ratten IgG (Dreiecke). Die Depletion erfolgte zu einem frühen Zeitpunkt an den Tagen -3, 0 und 5 vor bzw. nach Immunisierung (A). Hier ist beispielhaft ein Experiment aus zweien mit je fünf Tieren gezeigt. Bei der Untersuchung des mittleren Abschnittes der Induktionsphase erfolgte die Depletion an den Tagen 6 und 9 nach Immunisierung (B). Auch hier wurde beispielhaft ein Experiment aus zweien mit je fünf Tieren gezeigt. Außerdem wurde die Rolle der CD4⁺ Lymphozyten zu einem sehr späten Zeitpunkt der Induktionsphase untersucht. Hier erfolgte die Depletion an den Tagen 8 und 11 (C). Dargestellt wurden je fünf Mäuse pro Gruppe. Der Verlauf der Arthritisentwicklung wurde als Mittel \pm SEM dargestellt.

Die Kontrolltiere erhielten zum gleichen Zeitpunkt polyklonales Ratten IgG und entwickelten alle eine Arthritis. Abb. 4.37 A zeigt den klinischen Verlauf bei der Depletion zum frühen

Zeitpunkt. Dargestellt ist beispielhaft ein Experiment mit je fünf Tieren pro Gruppe. Beginnend von Tag 9 entwickelten die Kontrolltiere eine Arthritis mit einem maximalen mittleren Arthritisgrad von $4,8 \pm 1,5$ an Tag 16, die anschließend abnahm. Im Gegensatz dazu zeigte keines der mit dem Antikörper YTS191.1 behandelten Tiere zu irgendeinem Zeitpunkt im Beobachtungszeitraum von 30 Tagen klinische Zeichen einer Arthritis. Ein vergleichbares Resultat wurde erreicht, wenn die Depletion an den Tagen 6 und 9 nach Immunisierung mit rhG6PI erfolgte (Abb. 4.37 B). Auch hier ist beispielhaft ein Experiment mit fünf Mäusen dargestellt. Die Kontrolltiere entwickelten beginnend von Tag 9 an eine Arthritis, die an Tag 12 mit $6,2 \pm 0,8$ ihren maximalen mittleren Arthritisgrad erreichte und anschließend abnahm. Auch hier entwickelte keines der mit YTS191.1 behandelten Tiere eine Arthritis. Ein Tier zeigte an Tag 12 an einer Pfote eine leichte Schwellung, die jedoch am Tag darauf nicht mehr zu beobachten war. Abb. 4.37 C zeigt den klinischen Verlauf nach Depletion der $CD4^+$ Lymphozyten zu einem sehr späten Zeitpunkt der Induktionsphase an den Tagen 8 und 11. Die Kontrolltiere zeigten wieder einen normalen klinischen Verlauf der Arthritis mit dem Maximum der Arthritisentwicklung an Tag 12 mit einem mittleren Arthritisgrad von $5,4 \pm 0,8$. Obwohl die Depletion nur einen Tag vor der klinischen Manifestation der Arthritis durchgeführt wurde, entwickelten nur 2 der fünf mit YTS191.1 behandelten Tiere eine Arthritis mit mildem Verlauf. Bei einem der beiden Tiere beschränkten sich die klinischen Zeichen der Arthritis auf eine Pfote. Das andere Tier zeigte an zwei Gelenken eine Schwellung.

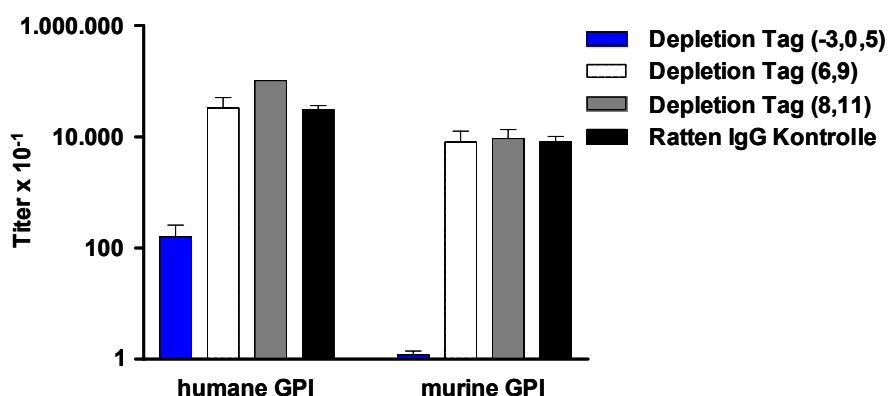


Abb. 4.38: Antikörpertiter gegen G6PI nach Depletion der $CD4^+$ Lymphozyten in der Induktionsphase. DBA/1 Mäuse wurden immunisiert und die $CD4^+$ Lymphozyten zu drei Zeitpunkten (früh: Depletion an Tag -3, 0 und 5; mittel: Depletion an Tag 6 und 9; spät: Depletion an Tag 8 und 11) der Induktionsphase mit dem Ratte-anti-Maus- $CD4$ Antikörper YTS191.1 depletiert. Die Kontrollgruppe erhielt zum gleichen Zeitpunkt polyklonales Ratten IgG. An Tag 23 nach Immunisierung mit rhG6PI wurde das Serum der Tiere gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern getestet. Die höchste Serumverdünnung von je fünf Tieren pro Gruppe bei der anti-G6PI Antikörper noch detektierbar waren, wurden als Mittel \pm SEM dargestellt. Die Antikörpertiter der Kontrolltiere wurden zusammengefasst und wurden als Mittel \pm SEM von insgesamt 14 Tieren dargestellt.

$CD4^+$ Lymphozyten spielten eine entscheidende Rolle bei Induktion der G6PI-induzierten Arthritis. Die Depletion zu einem sehr frühen und mittleren Zeitpunkt der Induktionsphase

verhinderte die Entwicklung der Arthritis völlig, während die Depletion der $CD4^+$ Lymphozyten zu einem späten Zeitpunkt der Induktionsphase noch teilweise protektive Wirkung hatte. Weiterhin wurde untersucht, ob die Depletion der $CD4^+$ Lymphozyten zu den oben beschriebenen Zeitpunkten einen Einfluss auf die Antikörperentwicklung gegen G6PI hatte. Serum dieser Tiere und der Kontrolltiere, die mit polyklonalem Ratten IgG behandelt wurden, wurde an Tag 23 gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen humane und murine G6PI getestet (Abb. 4.38). Die Antikörpertiter der Tiere, die mit polyklonalen Ratten IgG behandelt wurden, wurden zu einer Gruppe zusammengefasst. Die Kontrolltiere entwickelten an Tag 23 einen mittleren Antikörpertiter gegen humane G6PI von 1:31.085 und gegen murine G6PI von 1:8.114. Erfolgte die Depletion der $CD4^+$ Zellen zu einem Zeitpunkt vor der Immunisierung mit rhG6PI an den Tagen -3, 0 und 5, so war die Entwicklung der anti-G6PI Antikörper stark eingeschränkt. Bei diesen Tieren konnte an Tag 23 ein Antikörpertiter gegen humane G6PI von nur 1:160 gemessen werden. Gegen murine G6PI konnten nur sehr geringe Mengen spezifischer Antikörper detektiert werden. Im Gegensatz dazu entwickelten die Tiere, die an den Tagen 6 und 9 behandelt wurden und keine Arthritis entwickelten, hohe Titer gegen humane und murine G6PI. Die Titer lagen bei der humanen G6PI bei 1:33.280 und bei 1:8.080 bei der murinen G6PI. Einen ähnlichen Befund konnte beobachtet werden, wenn die Depletion an den Tagen 8 und 11 erfolgte. Hier erkrankten nur zwei der fünf Tiere und zeigten einen milden Verlauf. Dennoch entwickelten alle Tiere dieser Gruppe einen Titer gegen die humane G6PI von 1:102.400 und von 1:9.280 gegen murine G6PI. Die Depletion der $CD4^+$ Zellen vor der Immunisierung verhinderte die Entwicklung einer Arthritis in den behandelten Tiere und unterdrückte die Antikörperantwort gegen G6PI fast gänzlich. Bei einer späteren Depletion der $CD4^+$ Zellen in der Induktionsphase entwickelten die Tiere Antikörpertiter, die identisch bzw. sogar höher waren als in den Kontrolltieren.

4.4.7 $CD4^+$ Zelldepletion in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass $CD4^+$ Lymphozyten für die Entwicklung der G6PI-induzierten Arthritis von entscheidender Bedeutung waren. Hier wurde untersucht, ob $CD4^+$ Lymphozyten auch in der Effektorphase wichtig für den Verlauf der Arthritis sind. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert. An Tag 11 und 14 nach Immunisierung mit rhG6PI, also zu einem Zeitpunkt, wo die Arthritis schon voll entwickelt war, wurden die $CD4^+$ Lymphozyten mit dem Antikörper YTS191.1 depletiert. Zur Kontrolle wurde eine andere Gruppe mit polyklonalem Ratten IgG zur gleichen Zeit behandelt. Der klinische Verlauf

und die Inzidenz wurden über 30 Tage beobachtet (Abb. 4.39). Nach Immunisierung mit rhG6PI entwickelten sowohl die mit YTS191.1 behandelten Tiere als auch die mit Ratten IgG behandelten Kontrolltiere nach 9 Tagen eine Arthritis. Nach 11 Tagen entwickelten alle Tiere in jeder Gruppe eine Arthritis (Abb. 4.39 A). An diesem Tag erfolgte auch die erste Behandlung mit dem depletierenden bzw. dem Kontrollantikörper. Während die Inzidenz der Arthritis bei den Kontrolltieren zwischen dem 11. und 18. Tag zwischen 70% und 100% lag, nahm die Inzidenz der Arthritis bei den mit YTS191.1 behandelten Tieren in diesem Zeitraum auf bis zu 50% ab. Ab Tag 19 nahm die Inzidenz der Arthritis bei den Kontrolltieren kontinuierlich bis auf 40% an Tag 30 ab. Gleiches konnte auch bei den mit YTS191.1 behandelten Tieren beobachtet werden. Hier zeigten ab dem 25. Tag nach Immunisierung nur noch maximal 2 Tiere (20%) leichte Zeichen einer Arthritis.

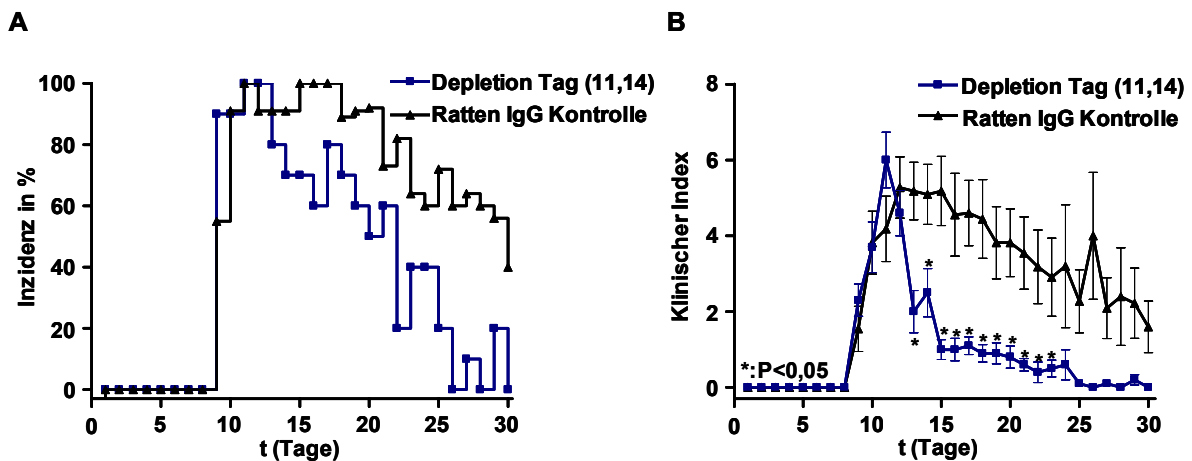


Abb. 4.39: CD4⁺ Zelldepletion in der Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis. DBA/1 Mäuse wurden mit rhG6PI immunisiert und die Inzidenz (A) und der klinische Verlauf der Arthritis (B) über 30 Tage beobachtet. Die CD4⁺ Lymphozyten wurden an den Tagen 11 und 14 nach Immunisierung mit dem Antikörper YTS191.1 durch i.p. Injektion depletiert (Quadrate). Die Kontrolltiere erhielten zur gleichen Zeit polyklonales Ratten IgG (Dreiecke). Insgesamt wurden je 10 Tiere pro Gruppe untersucht. Der klinische Verlauf wurde als Mittel \pm SEM je Gruppe dargestellt.

Auch der klinische Verlauf beider Gruppen war bis Tag 11 vergleichbar (Abb. 4.39 B). Beide Gruppen entwickelten ab Tag 9 eine Arthritis. Die mit YTS191.1 behandelten Tiere erreichten an Tag 11 einen maximalen mittleren Arthritisgrad von $6,0 \pm 0,7$, während die Kontrolltiere an Tag 12 ihren maximalen mittleren Arthritisgrad von $5,3 \pm 0,7$ erreichten. Bis Tag 15 blieb der Schweregrad der Arthritis bei den Kontrolltieren auf diesem Niveau und nahm dann langsam ab. An Tag 30 betrug der mittlere Arthritisgrad noch $1,6 \pm 0,7$. Ein anderes Bild zeigten die mit YTS191.1 behandelten Tiere. Schon zwei Tage nach der ersten Antikörperbehandlung nahm der mittlere Arthritisgrad von $6,0 \pm 0,7$ auf nur noch $2,0 \pm 0,6$ an Tag 13 ab. Nach der zweiten Behandlung mit YTS191.1 an Tag 14 war der mittlere Arthritisgrad von Tag 18 an bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes immer kleiner 1,0. Die Behandlung mit dem CD4⁺

zellenepletierenden Antikörper führte dazu, dass der klinische Verlauf der Arthritis sofort deutlich milder wurde und zur schnellen Gesundung der Tiere führte. Zwischen dem 13. und 22. Tag waren die klinischen Verläufe der Arthritis zwischen beiden Gruppen nach dem Mann-Whitney Test signifikant unterschiedlich mit $P < 0,05$. Neben dem klinischen Verlauf wurden auch die Antikörpertiter gegen G6PI nach der Behandlung mit YTS191.1 oder polyklonalem Ratten IgG an den Tagen 11 und 14 verglichen (Abb. 4.40). Dazu wurde von den eben beschriebenen Tieren an Tag 23 nach Immunisierung Serum gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen humane und murine G6PI untersucht. Die mit polyklonalem Ratten IgG behandelten Tiere entwickelten einen anti-G6PI Titer von 1:348.160 gegen humane G6PI und 1:21.760 gegen murine G6PI. Die mit YTS191.1 behandelten Tiere entwickelten auch hohe Titer gegen G6PI. Der Antikörpertiter gegen humane G6PI betrug 1:163.840 und 1:13.120 gegen murine G6PI. Obwohl die Depletion der $CD4^+$ Zellen in der Effektorphase zu einer schnellen Gesundung der Tiere führte, entwickelten diese Tiere hohe Antikörpertiter gegen G6PI.

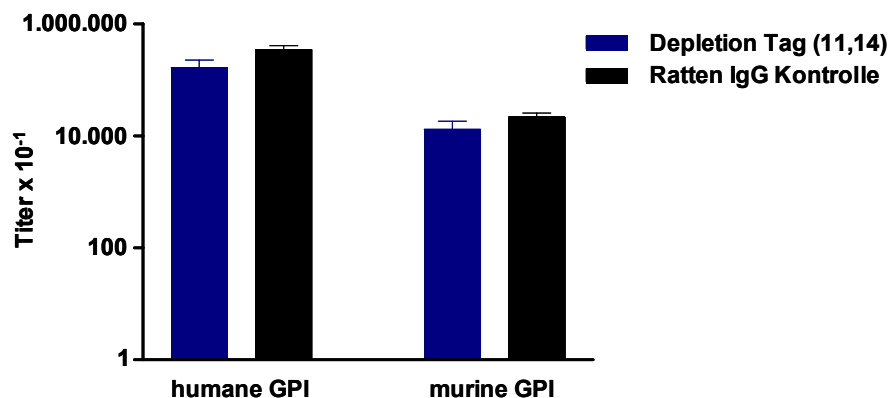


Abb. 4.40: Antikörpertiter gegen G6PI nach Depletion der $CD4^+$ Lymphozyten in der Effektorphase. DBA/1 Mäuse wurden immunisiert und die $CD4^+$ Lymphozyten an den Tagen 11 und 14 in der Effektorphase mit dem Ratte anti-Maus $CD4$ Antikörper YTS191.1 depletiert. Die Kontrollgruppe wurde zum gleichen Zeitpunkt mit polyklonalem Ratten IgG behandelt. An Tag 23 nach Immunisierung mit rhG6PI wurde das Serum der Tiere gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI Antikörpern getestet. Die höchste Serumverdünnung bei der anti-G6PI Antikörper noch detektierbar waren, ist als Mittel \pm SEM dargestellt.

4.4.8 Die Rolle der $CD4^+CD25^+$ Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

$CD4^+$ Lymphozyten waren für die G6PI-induzierte Arthritis sowohl für die Induktion aber auch in der Effektorphase von großer Bedeutung. Eine Depletion dieser Zellen verhinderte die Entwicklung der Arthritis bzw. führte zur schnellen Gesundung der Tiere. Eine Subpopulation der $CD4^+$ T-Zellen exprimiert $CD25$. Diese Zellen werden auch als regulatorische T-Zellen bezeichnet, wobei nicht alle $CD4^+CD25^+$ Zellen regulatorisch sind. Sie sind an der Aufrecht-

erhaltung der peripheren Toleranz gegen körpereigene Antigene beteiligt. Hier sollte untersucht werden, ob $CD4^+ CD25^+$ Zellen an der Entwicklung und am Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis beteiligt sind. $CD4^+ CD25^+$ Zellen wurden mit Hilfe des depletierenden Ratte anti-Maus $CD25$ Antikörpers pC61.5 depletiert. DBA/1 Mäusen wurden an den Tagen –28, –25, –21 und –14 vor Immunisierung mit rhG6PI mit $400\mu\text{g}$ des Antikörpers pC61.5 i.p. in PBS behandelt. Sowohl die $CD25$ depletierten DBA/1 Mäuse als auch die Kontrolltiere entwickelten eine Arthritis, die dem normalen zeitlichen Ablauf entsprach (Abb. 4.41 A). 11 Tage nach Immunisierung entwickelten 100% beider Gruppen eine Arthritis. Bis Tag 25 zeigten alle mit pC61.5 behandelten oder unbehandelten Tiere klinische Zeichen einer Arthritis. Anschließend lag die Inzidenz der Arthritis bei den pC61.5 behandelten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum bei ca. 90%.

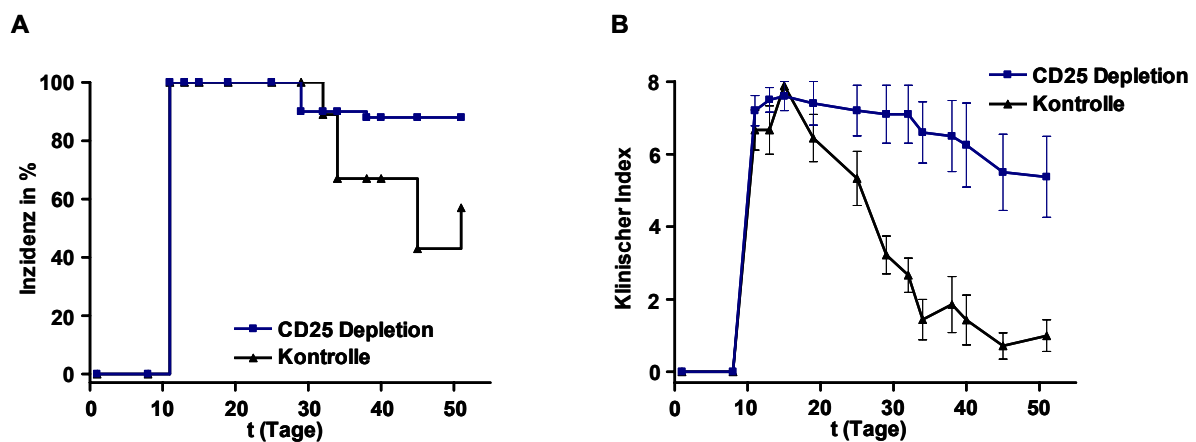


Abb. 4.41: Depletion der $CD4^+CD25^+$ Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis. 10 DBA/1 Mäuse wurden an den Tagen –28, –25, –21 und –14 vor Immunisierung mit rhG6PI mit $400\mu\text{g}$ des $CD25^+$ Zellen depletierenden Antikörpers pC61.5 i.p. behandelt (Quadrate). 9 DBA/1 Mäuse blieben unbehandelt und wurden an Tag 0 mit rhG6PI immunisiert (Dreiecke). Die Inzidenz (A) und der klinische Verlauf der Arthritis (B) wurden über einen Zeitraum von 51 Tagen beobachtet. Der klinische Verlauf wurde als Mittel der erkrankten Tiere \pm SEM dargestellt.

Bei den unbehandelten Kontrolltieren nahm die Inzidenz nach Tag 25 ab und schwankte zwischen 43-57%. Der klinische Verlauf beider Gruppen zeigte deutliche Unterschiede (Abb. 4.41 B). Sowohl die Kontrolltiere als auch die mit pC61.5 behandelten Tiere erreichten ihren maximalen mittleren Arthritisgrad an Tag 15 mit $7,6 \pm 0,4$ bei den behandelten Tieren und $7,9 \pm 0,1$ bei den Kontrolltieren. Bei den unbehandelten Tieren nahm der mittlere Arthritisgrad danach kontinuierlich ab und erreichte an Tag 34 einen Wert von $1,4 \pm 0,6$. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes blieb dieser Wert ungefähr gleich. Ein anderes Bild zeigten die mit pC61.5 behandelten Tiere. Der mittlere Arthritisgrad nahm bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag 51 kaum ab und besaß an Tag 51 immer noch einen Wert von $5,4 \pm 1,1$. Die klinischen Verläufe beider Gruppen unterschieden sich von Tag 25 an signifikant mit $P < 0,05$. Neben den unterschiedlichen klinischen Verläufen zeigte auch die histologische Un-

tersuchung an Tag 34 nach Immunisierung deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die mit pC61.5 behandelten Tiere zeigten noch 34 Tage nach Immunisierung eine hochgradige, florierende, chronische und destruktive Synovitis mit Pannusbildung (Abb. 4.42 A) während die Kontrolltiere an Tag 34 nur eine leicht verdickte Synovialmembran zeigten, die einer gering florierenden, chronischen aber nicht destruktiven Synovitis entsprach (Abb.42 B). Bisher konnte nur in dem DBA/1 Mausstamm eine Arthritis nach Immunisierung mit rhG6PI induziert werden. Nachdem gezeigt wurde, dass die Depletion von $CD25^+$ Zellen zu einem chronischen Verlauf der Arthritis in DBA/1 Mäusen führte, sollte untersucht werden, ob auch ein nicht-suszeptibler Stamm eine Arthritis nach $CD25^+$ Zelldepletion entwickelt.

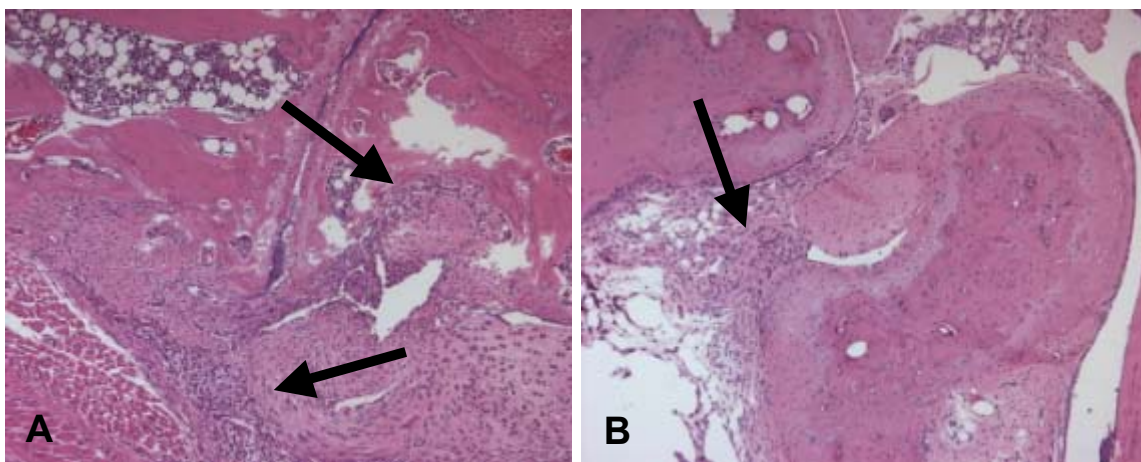


Abb. 4.42: Histologische Analyse nach Depletion der $CD25^+$ Zellen in DBA/1 Mäusen. DBA/1 Mäuse wurden an den Tagen -28, -25, -21 und -14 vor Immunisierung mit rhG6PI mit $400\mu\text{g}$ des $CD25^+$ Zellen depletierenden Antikörpers pC61.5 i.p. behandelt oder blieben unbehandelt. An Tag 34 nach Immunisierung wurden die Mäuse histologisch untersucht. Gezeigt ist eine HE-Färbung (100fache Vergrößerung) eines Gelenkschnittes einer Pfote einer Maus, die mit pC61.5 behandelt wurde (A). Der Pfeil markiert die hochgradig florierende, chronische und destruktive Synovitis vom Grad 3 und eine Pannusbildung. Im Gegensatz zeigt das unbehandelte Tier (B) eine leicht verdickte Synovialmembran und mit einer leichten Synovitis (Pfeil).

5 BALB/c Mäuse und 5 DBA/1 Mäuse wurden mit dem $CD25$ -depletierenden Antikörper pC61.5 wie oben beschrieben behandelt und an Tag 0 mit rhG6PI immunisiert. 5 DBA/1 erhielten zur Kontrolle an den gleichen Tagen eine Behandlung mit polyklonalem Ratten IgG und wurden anschließend auch mit rhG6PI immunisiert. Die Entwicklung der Arthritis wurde über einen Zeitraum von 22 Tagen verfolgt (Abb. 4.43). Anschließend wurden die Tiere an Tag 22 histologisch untersucht. Sowohl die mit pC61.5 als auch die mit Ratten IgG behandelten Tiere entwickelten nach 8 Tagen eine Arthritis. An Tag 10 zeigten bereits alle pC61.5 behandelten DBA/1 Mäuse eine Arthritis und 4/5 mit Ratten IgG behandelte Tiere. An Tag 10 zeigte nur 1/5 der BALB/c Mäuse eine leichte Schwellung an einer Pfote. Beide Gruppen der DBA/1 Mäuse erreichten an Tag 12 ihren maximalen mittleren Arthritisgrad mit $8,0 \pm 0$ bei

den Tieren, die mit dem anti-CD25 Antikörper behandelt wurden. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums zeigten diese Tiere keine Besserung.

Die Ratten IgG behandelten Tiere erreichten einen Wert von $6,2 \pm 1,5$. Anschließend nahm der Arthritisgrad langsam ab, zeigte an Tag 22 aber immer noch einen Wert von $5,0 \pm 1,7$. Die BALB/c Tiere entwickelten bis auf ein Tier klinisch keine Arthritis. Das Tier, das erkrankte, zeigte an Tag 10 an einer Pfote eine leichte Schwellung, die von Tag 17 an bis zum Ende des Beobachtungszeitraums jeden Tag deutlich zu beobachten war.

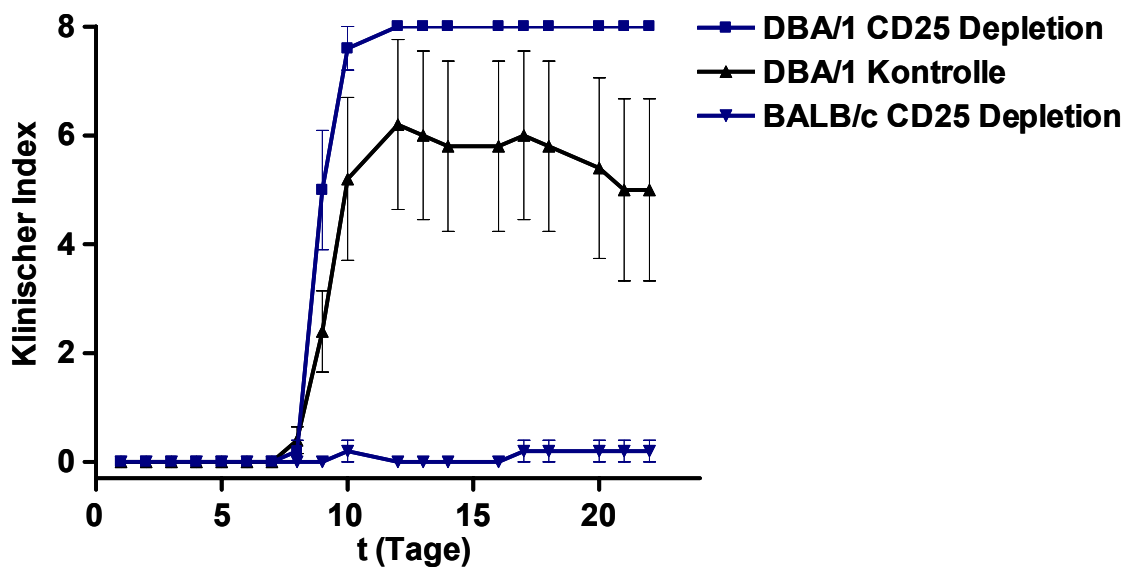


Abb. 4.43: CD25 Depletion und Arthritisinduktion mit G6PI in BALB/c Mäusen. 5 DBA/1 Mäuse (gefüllte blaue Dreiecke), bzw. 5 BALB/c Mäuse (umgedrehte blaue Dreiecke) wurden an den Tagen -28, -25, -21 und -14 vor Immunisierung mit rhG6PI mit $400\mu\text{g}$ des CD25⁺ Zellen depletierenden Antikörpers pC61.5 i.p. behandelt. DBA/1 Mäuse wurden zur gleichen Zeit mit polyklonalem Ratten IgG behandelt und an Tag 0 mit rhG6PI immunisiert (gefüllte schwarze Dreiecke). Der klinische Verlauf der Arthritis wurde über einen Zeitraum von 22 Tagen verfolgt. Der klinische Verlauf wurde als Mittel aller Tiere einer Gruppe \pm SEM dargestellt. 5/5 pC61.5 behandelte Tiere, 4/5 mit Ratten IgG behandelte Tiere und 1/5 der BALB/c Mäuse erkrankten.

Eine histologische Analyse dieses Gelenks (Abb. 4.44) zeigte eine leichte Infiltration der synovialen Deckzellschicht, die zu einer leichten Verdickung führte und einem Grad 1 der Synovitis entsprach. Knorpel- oder Knochendestruktionen wurden nicht beobachtet. Die Depletion von CD25⁺ Zellen führte zu einem chronischen Verlauf der Arthritis in den DBA/1 Mäusen. Trotz Depletion erkrankte nur eine von fünf BALB/c Mäusen. Histologisch und auch klinisch war der Verlauf der Arthritis in dieser Maus sehr mild. Insgesamt waren nur die Gelenke einer Pfote betroffen.

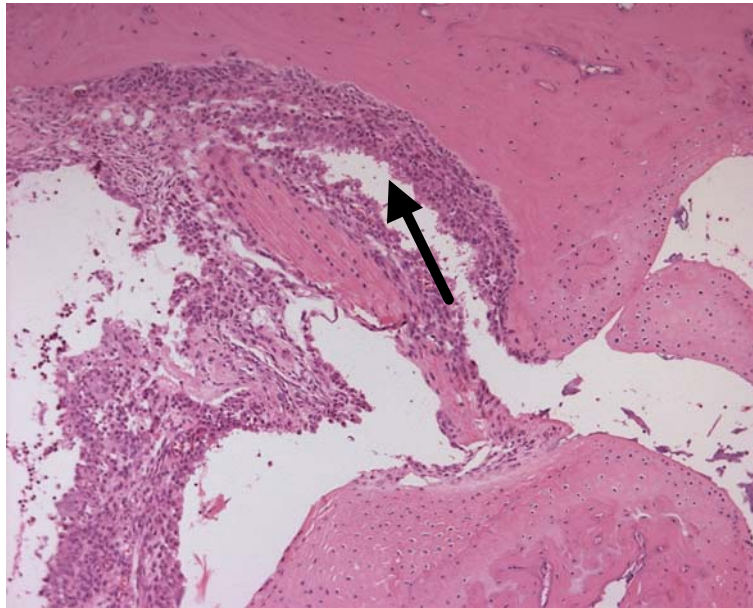


Abb. 4.44: Histologische Analyse nach Depletion der CD25⁺ Zellen in BALB/c Mäusen. BALB/c Mäuse wurden an den Tagen -28, -25, -21 und -14 vor Immunisierung mit rhG6PI mit 400µg des CD25⁺ Zellen depletierenden Antikörpers pC61.5 i.p. behandelt. An Tag 22 nach Immunisierung wurden die Mäuse histologisch untersucht. Gezeigt ist eine HE-Färbung (100fache Vergrößerung) eines Gelenkschnittes einer Pfote einer Maus, die klinisch eine leichte Arthritis entwickelte. Der Pfeil markiert die Synovitis vom Grad 1 in einem Gelenk dieser Pfote.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die arthritogene Rolle der Glukose-6-phosphat Isomerase (G6PI) in der Maus und die Relevanz der G6PI bei der Pathogenese der humanen rheumatoiden Arthritis untersucht. Im ersten Teil der Arbeit stand die Rolle der G6PI bei der Pathogenese der RA im Vordergrund. Bisher beschränkte sich die Suche nach Autoantigenen bei RA vor allem auf organspezifische, also gelenkspezifische, Autoantigene. DBA/1 Mäuse entwickeln eine symmetrische Polyarthritis nach Immunisierung mit G6PI. Damit konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit einem systemischen Antigen eine organspezifische Erkrankung in normalen nicht-transgenen Mäusen induziert. Dieses Modell schließt die Lücke zwischen dem transgenen K/BxN-Modell und der komplexen humanen Situation. Außerdem unterscheidet sich das G6PI-induzierte Arthritismodell in einigen Punkten deutlich von der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) und vom K/BxN-Modell. Die Untersuchung der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis könnte neue Anhaltspunkte für das Verständnis der Pathogenese der RA liefern.

5.1 Die Rolle von G6PI als Autoantigen in RA

5.1.1 Die Rolle der CD4⁺ T-Zellen

Es gibt viele Hinweise darauf, dass CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der RA spielen, z.B. aufgrund der Prädisposition durch bestimmte MHC-II Allele. Therapeutisch wird gerade damit begonnen, Patienten mit RA mit einem CTLA-4-Ig Fusionsprotein zu behandeln, welches verhindert, dass T-Zellen ein kostimulatorisches Signal bekommen (Kremer et al. (2003), Moreland et al. (2002)). Mäuse mit einer Mutation in der SH2-Domäne von ZAP-70, einem wichtigen Molekül bei der Signaltransduktion in T-Zellen, entwickeln spontan eine schwere Arthritis (Sakaguchi et al. (2003)). Obwohl klar ist, dass CD4⁺ T-Zellen eine Rolle bei der Pathogenese der RA spielen, konnte noch kein Autoantigen identifiziert werden, für das eine klare pathogenetische Beteiligung bei der Entwicklung der RA bewiesen werden konnte. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Patienten eine erhöhte Frequenz autoreaktiver G6PI spezifischer CD4⁺ T-Zellen besitzen. Sollte eine erhöhte Frequenz dieser Zellen vorhanden sein, so müsste in einem nächsten Schritt deren Beteiligung an der Pathogenese untersucht werden. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit RA vorwiegend das Th1 spezifische Zytokin IFN- γ produzieren (Dolhain et al. (1996), Morita et al. (1998)). Weiterhin konnte in den T-Zellen von RA-Patienten in der Synovialflüs-

sigkeit auch TNF- α detektiert werden (Steiner et al. (1999)). Deshalb wurden CD4⁺ T-Zellen mit rhG6PI und anderen Antigenen restimuliert und die Produktion von TNF- α und IFN- γ über durchflusszytometrische Analysen bestimmt. Das Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) wurde als Positivkontrolle gewählt. Als Negativkontrollen wurden die irrelevanten Antigene Ovalbumin (Ova) und das rekombinante und histidinmarkierte outer surface protein A (OspA) von *Borrelia burgdorferi* verwendet. Die Verwendung der irrelevanten Antigene diente dazu, die Hintergrundproduktion der Zytokine in den CD4⁺ T-Zellen zu messen und den Einfluss von mikrobiellen Rückständen bzw. der Histidinmarkierung auszuschließen. Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.1.1 zeigen, produzierten sowohl die RA-Patienten als auch die gesunden Spender kaum TNF- α oder IFN- γ nach Restimulation mit rhG6PI, Ova und OspA. Die Restimulation mit SEB zeigt jedoch, dass das Experiment an sich funktioniert, da dort hohe Zytokinantworten zu messen waren. Die Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen RA-Patienten und gesunden Spendern ist in keiner Gruppe signifikant unterschiedlich. Aus diesen Ergebnissen könnte der Schluss gezogen werden, dass es keine G6PI-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in den Patienten mit RA gibt. Es müssen jedoch zusätzliche Faktoren in Betracht gezogen werden. Zum Einen wurden bisher nur die Zytokine IFN- γ und TNF- α untersucht. Wenn eine G6PI assoziierte RA jedoch nur eine kleine Subpopulation von RA-Patienten betrifft, so könnten in dieser Subpopulation auch andere Zytokine, wie zum Beispiel IL-4, eine Rolle spielen. Das K/BxN-Modell für RA ist ein antikörpervermitteltes Modell. IL-4 spielt bei B-zellvermittelten Immunantworten eine große Rolle. Es ist daher durchaus möglich, dass die CD4⁺ T-Zellen der RA-Patienten, wo G6PI als Autoantigen fungiert, eher mit Th2 assoziierten Zytokinen wie IL-4 antworten. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Gewinnung der T-Zellen. In den hier beschriebenen Experimenten wurden Zellen verwendet, die aus dem Blut stammen. Es ist durchaus denkbar, dass die autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen schon an den Ort der Entzündung ins Gelenk migriert sind. Weiterhin muss auch bedacht werden, dass die untersuchten Patienten sich in Therapie befanden. Da keine detaillierten Informationen über den Behandlungsstatus der Patienten bei Verwendung des Blutes vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige dieser Patienten auch mit stark immunsupprimierenden Therapeutika, wie z.B. Glukokortikoiden behandelt wurden und daher nur geringe Mengen der Zytokine gemessen werden konnten. SEB dagegen ist so ein starker Stimulus für die Zellen, dass eine Schwelle überschritten wird, die diese Zellen dann doch noch antworten lässt. Möglicherweise liegen die CD4⁺ T-Zellen auch in einem anergen oder zumindest partiell tolerantem Zustand vor. Es konnte schon früher beobachtet werden, dass CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut von RA-Patienten nur schlecht mit Antigenen restimuliert werden können, gegen die es schon

einmal zu einer Immunreaktion, z.B. in Form einer Influenza oder Herpes simplex Infektion, gekommen war (Verwilghen et al. (1990)). In T-Zellen im Synovium von RA-Patienten konnte auch die Expression von Genen beobachtet werden, die relevant für Anergie sind (Ali et al. (2001)), sowie eine verminderte Expression der Antioxidantie Glutathion, was eine Störung des Redoxgleichgewichtes hervorruft und dadurch für eine verminderte Aktivierbarkeit der T-Zellen verantwortlich ist (Maurice et al. (1997)). In einem transgenen Mausmodell, wo das endogene Kollagen II so mutiert wurde, dass es dem Ratten Kollagen II entsprach, konnte gezeigt werden, dass die $CD4^+$ T-Zellen nach Immunisierung mit Ratten Kollagen II zwar noch $IFN-\gamma$ produzieren, auch eine Kollagen-induzierte Arthritis entwickeln, aber nicht mehr so stark proliferieren. In diesem Modell kam es zu einer partiellen Tolerisierung gegen das Kollagen II (Malmstrom et al. (1996)). Es wird spekuliert, dass $CD4^+$ T-Zellen hauptsächlich an der Initiation beteiligt sind (Firestein und Zvaifler (1990)) und später möglicherweise in einen anergen und toleranten Zustand übergehen. Die oben erwähnten Studien, bei der das CTLA-4-Ig Fusionsprotein, welches auf T-Zellen wirkt und bei der Therapie von RA eingesetzt wird, widersprechen dieser Theorie.

5.1.2 Die Rolle der B-Zellen und anti-G6PI Antikörper

Neben den T-Zellen wird auch den B-Zellen und den von ihnen produzierten Autoantikörpern bei der Pathogenese der RA eine große Rolle zugeschrieben. Hauptsächlich rührt dies daher, dass mehr als zwei Drittel der RA-Patienten die sogenannten Rheumafaktoren (RF) entwickeln (Dorner et al. (2004)). Neben den RF konnten noch zahlreiche andere Autoantikörper identifiziert werden, deren Beteiligung an der Pathogenese von RA bisher aber nicht bewiesen werden konnte (Smolen und Steiner (1998)). Hier wurde untersucht, ob Patienten mit RA Autoantikörper gegen G6PI produzieren. Bei der Untersuchung von Seren von RA-Patienten und Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen konnten keine signifikanten Unterschiede zu den gesunden Spendern festgestellt werden. Erhöhte anti-G6PI Titer konnten nur in sehr wenigen Patienten aber auch in gesunden Spendern detektiert werden (Kapitel 4.1.2). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass anti-G6PI Antikörper im Serum nicht vorhanden sind. Weiterhin stellt diese Arbeit einen starken Kontrast zu zwei Studien dar, die behaupten, dass 64% bzw. 45% der RA-Patienten einen erhöhten Titer gegen G6PI entwickeln (Jouen et al. (2004), Schaller et al. (2001)). Das G6PI, welches in diesen Studien verwendet wurde, stammt aus dem Kaninchen Muskel und ist kommerziell bei Sigma erhältlich. Sowohl in der Studie von Schaller et al. als auch in dieser Arbeit wurde eine Verdünnung des Serums von 1:50 verwendet. Damit ist das Serum sehr stark konzentriert, und es besteht leicht die Gefahr,

das aufgrund von unspezifischen Bindungen Falschpositive Resultate erzielt werden. Da die Ergebnisse so stark variierten, war die Frage, ob das in dieser Arbeit verwendete G6PI möglicherweise nicht richtig gefaltet war, da es rekombinant in Bakterien hergestellt und histidinmarkiert vorlag und aufgrund von Konformationsunterschieden nicht von den anti-G6PI Antikörpern erkannt wurde. Da das rhG6PI aber enzymatisch aktiv war, kann davon ausgegangen werden, dass die Konformation dem endogenen humanen G6PI entspricht. Auch eine falsche Versuchsdurchführung scheidet aus, da unter Verwendung des kommerziellen Kaninchen G6PI auch in dieser Studie erhöhte Titer gegen G6PI in Patienten nicht aber in gesunden Patienten gemessen werden konnten. Der Unterschied musste daher an den unterschiedlichen Präparationen liegen. Wie die Auftrennung beider Präparationen im SDS-Gel zeigte (Kap. 4.1.3), wies die Kaninchen G6PI Präparation mehrere kontaminierende Banden auf. Im Immunoblot zeigten einige der gegen das Kaninchen G6PI positiv getesteten Seren eine Bindung an ein Protein bei 40 kDa. Dieses Protein konnte in der MALDI-MS Analyse als die M-Kette der Kreatinkinase (CK-M) identifiziert werden und stellt ein neues potentiell Autoantigen in RA da (Kap. 4.1.3 und Kap. 4.1.4). Die Hauptquelle der Kreatinkinase, der Muskel, deutet jedoch nicht daraufhin, dass dieses Antigen bei der Entstehung der RA eine Rolle spielen kann, und es ist fraglich, ob sie auch im Gelenk zu finden ist. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass sich Immunkomplexe aus CK-M und Antikörpern bilden, die sich im Gelenk ablagern und dadurch pathogen sind. In der Literatur ist beschrieben, dass die CK Aktivität im Serum bei Patienten mit RA oder SLE reduziert ist (Lee et al. (2000), Sanmarti et al. (1996)). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf der Bildung von Immunkomplexen, so dass die CK nicht mehr zur Verfügung steht. Ob tatsächlich auch einige Patienten G6PI erkannten, war im Immunoblot nicht zu beurteilen, da nur lineare Epitope detektiert werden konnten. Auch in anderen Studien konnten keine erhöhten Antikörpertiter gegen G6PI in einer Mehrzahl der RA-Patienten nachgewiesen werden (Herve et al. (2003), Kassahn et al. (2002), Matsumoto et al. (2003)). In unserer und in einer anderen Gruppe konnte zudem gezeigt werden, dass Antikörper gegen G6PI auch nicht in Patienten mit juveniler Arthritis auftreten (Schepp et al. (2004), Schmitt et al. (2004)). Es ist nicht auszuschließen, dass anti-G6PI Antikörper hauptsächlich im Synovium des entzündeten Gelenks vorkommen, was durch zwei Studien gestützt wird, die anti-G6PI Antikörper verstärkt in entzündeten Gelenken und in der Synovialflüssigkeit detektieren können (Cha et al. (2004), Schaller et al. (2001)). Daneben gibt es Hinweise, dass anti-G6PI Antikörper bei einer speziellen besonders aggressiven Form der RA dem Felty-Syndrom auftreten (van Gaalen et al. (2004)). Insgesamt ist die Frage, ob diese Antikörper pathologisch relevant sind oder nur ein Epiphänomen darstellen. Da G6PI in jeder lebenden

Zelle vorkommt, könnte es möglicherweise sein, dass sich Antikörper gegen G6PI aufgrund der Destruktion des Gewebes bilden, da G6PI bei Zerstörung des Gewebes freigesetzt wird. Auch wenn Antikörper gegen G6PI nicht sehr häufig auftreten, ist trotzdem die Frage, wie diese Antikörper gebildet werden. Im Menschen sind mehrere Polymorphismen der G6PI bekannt und eine Hypothese besagt, dass die Bildung von Antikörpern gegen G6PI mit der Expression bestimmter G6PI Varianten assoziiert ist (Muraki et al. (2004)). In RA-Patienten, die über anti-G6PI Antikörper verfügen, tauchen dieser Studie zufolge signifikant vermehrt G6PI-Varianten auf. Zusammenfassend kann jedoch der Schluss gezogen werden, dass G6PI wahrscheinlich nicht das wesentliche Autoantigen ist, welches für RA verantwortlich ist.

5.2 Die Rolle der G6PI als Autoantigen in der Maus

5.2.1 Die Suszeptibilität für G6PI-induzierte Arthritis in unterschiedlichen Mausstämmen

Da Patienten mit RA weder eine T-Zellantwort noch eine ausgeprägte B-Zellantwort gegen G6PI in Form der Produktion von Autoantikörpern entwickeln, kann vermutet werden, dass G6PI bei der Pathogenese der RA - wenn überhaupt - nur eine untergeordnete Rolle bzw. bei nur einer sehr kleinen Subpopulation von RA-Patienten eine Rolle spielt. Damit steht aber weiter die Frage im Raum, ob G6PI bei der Entstehung von organspezifischen Autoimmunerkrankungen eine pathologisch signifikante Rolle spielen kann. In Mäusen wurde daher versucht durch Immunisierung mit rhG6PI, eine Arthritis zu induzieren. Durch die Induktion einer Arthritis in genetisch nicht veränderten Tieren konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Autoimmunreaktion gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen zu einer organspezifischen Erkrankung in normalen Tieren führt. Dieses Modell erlaubt möglicherweise die Identifizierung neuer Mechanismen, die für die Pathogenese von RA bedeutend sind. Für die Arthritisinduktion mit rhG6PI wurden unterschiedliche Mausstämmen ausgewählt. Diese Stämme waren zuvor schon in anderen Modellen für Autoimmunerkrankungen in Erscheinung getreten bzw. sind Stämme, die häufig im Labor bei vielen Fragestellungen eingesetzt werden. Nach Immunisierung mit rhG6PI entwickelte nur der DBA/1 Stamm eine Arthritis mit einer Inzidenz von über 95% (Kap. 4.2.1). Damit ist der DBA/1 Stamm neben der CIA auch für die G6PI-induzierte Arthritis suszeptibel. Bis heute ist nicht genau bekannt, warum der DBA/1 Stamm suszeptibel ist für Arthritis. Ein bekannter Faktor ähnlich wie beim Menschen ist der MHC locus. Mäuse, die den MHC-Haplotyp H2-q exprimieren, weisen eine erhöhte Suszeptibilität für die CIA auf (Wooley et al. (1981)). DBA/1 und B10.Q exprimieren beide den

MHC-Haplotyp H2-q und sind suszeptibel für die CIA. Dagegen sind Mäuse vom B10.A Stamm resistent gegen CIA und exprimieren den MHC-Haplotyp H2-k, obwohl sie sonst genetisch identisch mit dem B10.Q Stamm sind. Durch Verwendung der Stämme B10.A und B10.Q sollte untersucht werden, ob der MHC-Haplotyp eine ähnlich wichtige Rolle bei der Entwicklung der G6PI-induzierten Arthritis spielt wie in der CIA. Da in dieser Arbeit die B10.Q Mäuse nicht-suszeptibel waren, konnte die Beteiligung des MHC-Haplotyps nicht gezeigt werden. In jüngster Vergangenheit gab es jedoch Hinweise, dass der H2-q Haplotyp doch eine ähnlich wichtige Rolle spielt wie im CIA-Modell. Im C3H.Q und auch im B10.Q Stamm konnte eine Arthritis mit G6PI-induziert werden, die im Fall des C3H.Q Stamm sogar chronisch verlief (Bockermann, Schubert et al., Manuskript eingereicht). Das widerspricht dieser Studie, wo B10.Q Mäuse keine Arthritis entwickelten. Ein Grund dafür könnte in der Verwendung von B10.Q Mäusen liegen, die von Jackson Laboratories bezogen wurden. B10.Q Mäuse von Jackson Laboratories besitzen eine natürliche Mutation auf Chromosom 9 im Gen der Januskinase Tyk2 und sind auch resistent gegen CIA (Shaw et al. (2003)). B10.Q Mäuse anderer Anbieter, die nicht über diese Mutation verfügen, entwickeln eine G6PI-induzierte Arthritis mit einem milderen Verlauf als die DBA/1 Tiere (Bockermann, Schubert et al., Manuskript eingereicht). Durch dieses Ergebnis wird deutlich, dass der MHC-Haplotyp von entscheidender Bedeutung für die G6PI-induzierte Arthritis ist. Unterstützt wird dieser Befund durch die Resistenz der DBA/2 Mäuse, die dem DBA/1 Stamm genetisch sehr ähnlich sind, aber den MHC-Haplotyp H2-d exprimieren. Daraus lässt sich auch direkt schlussfolgern, dass T-Zellen eine entscheidende Bedeutung bei der G6PI-Arthritis zuteil wird. Das neben dem MHC-locus auch noch andere Gene beteiligt sind, zeigt der Fakt, dass C3H.NB Mäuse eine ausgeprägte G6PI-induzierte Arthritis entwickeln. B10.P Mäusen, die zwar über den gleichen MHC locus verfügen, ansonsten genetisch völlig unterschiedlich zu den C3H.NB Mäusen sind, entwickeln keine Arthritis (Bockermann, Schubert et al., Manuskript eingereicht). Auch die F₁ Generation einer Kreuzung aus DBA/1 und C57BL/6 entwickelte keine Arthritis, was zeigt, dass die relevanten nicht-MHC Gene nicht dominant sind. Ein weiterer H2-q kongener Stamm ist der SWR Stamm. Dieser Stamm ist trotz der Expression von H2-q nicht für die G6PI-induzierte Arthritis und CIA suszeptibel (Reife et al. (1991)). Der SWR Stamm weist einen T-Zelldefekt auf, da ihm ca. 50% des V β Gens fehlt (Behlke et al. (1986)). Zusätzlich ist der SWR Stamm defizient für das Komplement Protein C5 (Erickson et al. (1964)). Da in der G6PI-induzierten Arthritis sowohl die CD4⁺ T-Zellen als auch das Komplement von Bedeutung sind (siehe Kap. 4.3.6, Kap. 4.4.6 und Kap. 4.4.7) entwickeln die SWR Mäuse möglicherweise aufgrund des T-Zelldefekts und der C5 Defizienz keine Arthri-

tis. Menschen, die ein bestimmtes Allel des HLA-DR locus exprimieren sind prädisponiert für die Entwicklung von RA. HLA-DRB0401 transgene Tiere sind jedoch resistent gegen die G6PI-induzierte Arthritis, obwohl einer der verwendeten Stämme auf den DBA/1 Stamm zurückgekreuzt war und suszeptibel für die CIA ist. Interessanterweise ist in der CIA das von HLA-DRB0401 erkannte Epitop des Kollagens II (257-270) das Gleiche, welches auch von I-A^q in den DBA/1 Mäusen erkannt wird (Andersson et al. (1998)). Man kann also davon ausgehen, dass beide MHC-Moleküle ähnliche Bindungseigenschaften haben. Möglicherweise werden jedoch in der G6PI-induzierten Arthritis unterschiedliche Epitope von I-A^q und HLA-DRB0401 präsentiert, wobei die immunodominanten Epitope in den DBA/1 Mäusen pathogen sind und bei den HLA-DRB0401 transgenen Tieren nicht. Außerdem ist nicht klar, ob in diesen Mäusen der MHC-II auch genauso stark exprimiert wird wie in den Wildtyp DBA/1 Mäusen.

5.2.2 Der histologische Befund in den unterschiedlichen Mausstämmen und die Eignung als Modell für die rheumatoide Arthritis

Neben dem klinischen Erscheinungsbild wurden alle Stämme nach Immunisierung mit G6PI auch histologisch untersucht (Kap. 4.2.4). Die klinischen Merkmale in den DBA/1 Mäusen waren stark ausgeprägt, so dass in diesem Stamm kein Zweifel bestand, dass diese Tiere eine Arthritis entwickelten. In den anderen Stämmen waren diesen Merkmale nicht zu beobachten. Es ist nicht auszuschließen, dass auch andere Stämme eine Entzündung des Gelenks ausbildeten, die jedoch klinisch nicht zu sehen war. Diesen Fall kann z.B. bei der Induktion der Lyme Arthritis in C57BL/6 Mäusen beobachtet werden (Maier, et al., unveröffentlichte Daten). Die histologische Analyse der Gelenke der Vorder- und Hinterläufe dieser Stämme zeigte jedoch, dass keiner der klinisch unauffälligen Stämme eine Infiltration inflammatorischer Zellen in den Gelenken aufwies. Zusätzlich wurden auch die DBA/1 Mäuse histologisch untersucht (Kap. 4.2.3). Diese Untersuchung ist wichtig, da die Histopathologie Aufschluss darüber gibt, wie stark die G6PI-induzierte Arthritis der Pathologie der RA ähnelt und auf ähnliche pathologische Mechanismen schließen lässt. In den DBA/1 Mäusen kann nach Induktion der Arthritis übereinstimmend mit der RA eine symmetrische Polyarthritits beobachtet werden, die sich in den Vorderläufen in den Handgelenken, den metacarpalen sowie den proximalen interphalangealen Gelenken und in den Hinterläufen in den tarsalen Gelenken manifestiert. Zusätzlich gibt es aber auch kleine Unterschiede zur RA. In den Vorderläufen sind auch die distalen interphalangealen Gelenke betroffen. In den Hinterläufen manifestiert sich die Arthritis sehr stark vor allem in den Fußknöcheln. Das Kniegelenk dagegen ist nur bei sehr schweren Ver-

läufen betroffen. Im Unterschied zur RA sind die Schultern nicht betroffen. Neben den Gelenken wurden auch die inneren Organe in den DBA/1 Mäusen untersucht (Kap. 4.2.5). Weder die inneren Organe, noch das ZNS, sind betroffen. Das ist ein ganz entscheidender Punkt. Da G6PI ein systemisches Antigen ist, konnte spekuliert werden, dass nicht nur die Gelenke betroffen sind, sondern zusätzlich auch andere Organe. Im K/BxN-Modell konnte gezeigt werden, dass G6PI auf der Oberfläche von Muskeln und der Niere zu finden ist (Matsumoto et al. (2002)). Obwohl durch die Immunisierung mit G6PI eine Immunreaktion gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen induziert wurde, entwickeln die Mäuse eine auf die Gelenke beschränkte, also organspezifische, Entzündung. Auch der histopathologische Befund zeigt, dass die Entzündung stark der RA ähnelt. So kann vor allem eine schwere Synovitis festgestellt werden, die in Pannusformation und Knorpel- und Knochendestruktion mündet. Merkmale, die exakt auf RA zutreffen. Die G6PI-induzierte Arthritis zeigt zum ersten Mal, dass die Immunisierung von normalen Mäusen mit einem systemischen Antigen eine Arthritis induzieren kann, die stark der humanen RA ähnelt. Dieses Modell eignet sich daher sehr gut, die pathologischen Mechanismen der Arthritsentwicklung zu untersuchen.

5.2.3 Die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis mit endogener, denaturierter und heterologer G6PI

Im Modell der G6PI-induzierten Arthritis entwickeln die Tiere 9 Tage nach Immunisierung eine Arthritis, die an Tag 14 ihren Höhepunkt erreicht und dann langsam wieder abnimmt (Kap. 4.2.2). Die Arthritis entwickelt sich sehr früh, zu einem Zeitpunkt, wo gerade erst erste zelluläre und humorale Antworten gegen G6PI gemessen werden können. Damit unterscheidet sich der Verlauf maßgeblich von der CIA aber auch vom K/BxN-Modell. Im K/BxN-Modell entwickeln sich spontan Antikörper gegen G6PI, die sobald sie eine gewisse Affinität und Konzentration überschritten haben, zu einem chronischen Verlauf der Arthritis in den K/BxN Mäusen führen. Auch in der CIA reicht eine primäre Immunisierung mit heterologem CII aus, um eine Arthritis in DBA/1 Mäusen zu induzieren. In diesem Modell können T- und B-Zellantworten schon nach 5-10 Tagen detektiert werden. Erste Infiltrationen inflammatorischer Zellen im Gelenk können jedoch erst zwei Wochen später beobachtet werden, die dann nach 3-4 Wochen langsam in eine sich entwickelnde Arthritis im Gelenk münden (Holmdahl et al. (2002), Holmdahl et al. (1988), Holmdahl et al. (1985a)). Interessant an diesen beiden unterschiedlichen Verläufen ist, dass Kollagen II im Gelenk sehr prominent vorhanden ist, während G6PI ubiquitär vorliegt. Auch wenn das Kollagen möglicherweise sehr isoliert im Gelenk vorliegt und daher in den lymphatischen Organen von professionellen APC selten

präsentiert wird, so führt doch die Immunisierung mit CII zu einer frühen und starken Antwort gegen CII. Daher wäre zu erwarten, dass sich die CIA schneller entwickelt, da eine Immunreaktion von Beginn an gegen das Gelenk gerichtet sein müsste. Bei der G6PI liegt der Fall genau andersherum. G6PI kommt überall vor, und bei einer Immunreaktion gegen G6PI könnte eher mit einer systemischen Entzündung gerechnet werden. Eine wichtige Rolle für die frühe Entwicklung der Arthritis könnte dabei die biologische Funktion des G6PI spielen. Die Glukose-6-phosphat Isomerase ist vor allem bekannt als ein glykolytisches Enzym. Neben dieser intrazellulären Funktion im Energiestoffwechsel hat G6PI aber auch extrazelluläre Funktionen. Außerhalb der Zelle agiert G6PI mehr als Zytokin. G6PI ist das gleiche Protein wie Neuroleukin (Chaput et al. (1988), Faik et al. (1988)) und agiert als Zytokin, welches B-Zellen anregen kann, Antikörper zu sezernieren (Gurney et al. (1986a)) und wirkt als Nervenwachstumsfaktor, der das Überleben und Wachstum embryonaler Rückenmarksnerven und sensorischer Nerven unterstützt (Gurney et al. (1986b)). Neben Neuroleukin ist G6PI auch als autocrine motility factor (AMF) bekannt und wirkt als Zytokin, welches wahrscheinlich eine große Bedeutung bei der Bildung von Metastasen bei Krebs hat (Watanabe et al. (1996)). AMF bindet an einen 78 kDa großen stark glykolisierten G-Protein gekoppelten Sieben-Transmembranrezeptor, den AMF-Rezeptor (gp78) (Shimizu et al. (1999, Tsutsumi et al. (2002), Watanabe et al. (1991)). Weiterhin ist G6PI auch unter „differentiation and maturation mediator“ (DMM) bekannt und ist an der Differenzierung von humanen myeloiden leukämischen HL-60 Zellen zu terminalen Monozyten beteiligt (Xu et al. (1996)). Bis jetzt ist wurde noch nicht gezeigt, welche Zellen G6PI sekretieren und welche Zellen den Rezeptor exprimieren. Die Tatsache, dass G6PI von Lektin stimulierten T-Zellen sezerniert wird und die Produktion von Immunglobulinen anregt, zeigt jedoch, dass G6PI auf das Immunsystem Einfluss nehmen kann (Gurney et al. (1986a)). Es ist daher durchaus denkbar, dass bei einer Immunantwort gegen G6PI, das G6PI als sein „eigenes Adjuvans“ wirkt. Durch die Immunisierung mit G6PI wird die Konzentration von G6PI in der Maus erhöht und G6PI kann verstärkt an den AMF-Rezeptor binden. Möglicherweise wird dadurch die anti-G6PI Antikörperproduktion verstärkt, indem G6PI nicht nur vom B-Zellrezeptor sondern gleichzeitig auch vom AMF-Rezeptor gebunden wird und die B-Zelle eine Art kostimulatorisches Signal über diesen Rezeptor erhält. Denkbar ist auch, dass andere Effektorzellen durch G6PI an den Entzündungsherd wandern, aktiviert werden und über den AMF-Rezeptor aufgenommenes G6PI verstärkt auf der Oberfläche präsentieren. Um zu untersuchen, ob die biologische Funktion der G6PI bei der Entwicklung der Arthritis eine Rolle spielt, wurden DBA/1 Mäuse mit denaturierter G6PI immunisiert (Kap. 4.2.7). Die G6PI wurde dazu gekocht, fiel aus und besaß keine en-

zymatische Aktivität mehr. Trotz Denaturierung der G6PI entwickelten die Tiere eine Arthritis mit stark ähnelnder Inzidenz und Verlauf der Erkrankung im Vergleich zu der Immunisierung mit nativer G6PI. Dies zeigte deutlich, dass die enzymatische Aktivität der G6PI keinen Einfluss auf die Entwicklung der Arthritis hat. Daneben kann aber die Hypothese der besonderen biologischen Aktivität der G6PI nicht völlig ausgeschlossen werden, da die endogene murine G6PI weiter frei verfügbar ist. In der Zukunft wird es von besonderem Interesse sein, welche Zellen des Immunsystems den AMF-Rezeptor exprimieren und ob die Bindung von G6PI an den Rezeptor die Produktion von Antikörpern oder pro-inflammatorischer Zytokine induziert. Möglicherweise liegt das besondere Potential der G6PI darin zum Einen ein Antigen zu sein, welches von den Zellen des Immunsystems erkannt wird und zum Anderen aber auch gleichzeitig bestimmte Effektorfunktionen auf das Immunsystem ausüben kann. Daneben zeigt die Arthritisinduktion mit denaturierter G6PI, dass die dreidimensionale Struktur des Antigens keine große Rolle spielt. Das legt die Vermutung nahe, dass insbesondere T-Zellen an der Induktion beteiligt sind. Bei der Aktivierung von T-Zellen spielt die Struktur keine Rolle, da das Antigen in Form eines Peptid-MHC Komplexes den T-Zellen präsentiert wird und somit nicht in seiner nativen Form vorliegt. Neben der Immunisierung mit denaturierter G6PI wurde auch untersucht, ob die Konzentration der G6PI im Serum des DBA/1 Stammes und der nicht-suszeptiblen Stämme BALB/c und C57BL/6 unterschiedlich ist (Kap. 4.2.9). Das endogene G6PI in der Maus, vor allem im Serum, könnte unterschiedlichen Einfluss auf die Arthritisinduktion nehmen. Eine hohe Konzentration im Serum könnte dazu führen, dass autoreaktive G6PI-spezifische T-Zellen, die im Blut zwischen den lymphatischen Organen hin- und herwandern in einen anergen Zustand übergehen, da ihnen ständig G6PI ohne kostimulatorisches Signal präsentiert wird. Eine niedrige Konzentration könnte den Effekt haben, dass die periphere Toleranz z.B. in Form der Anergie nicht vorhanden ist und dadurch eine erhöhte Frequenz aktivierbarer autoreaktiver Zellen vorhanden ist, die nach Immunisierung mit G6PI zu einer starken Immunantwort führt. Die Ergebnisse zeigen aber, dass die G6PI-Konzentrationen vergleichbar sind und der DBA/1 Stamm von der Konzentration her sogar genau zwischen den beiden nicht-suszeptiblen Stämmen BALB/c und C57BL/6 liegt. Die Serumkonzentration des G6PI allein scheint also keinen Einfluss auf die Arthritisentwicklung zu nehmen. Bei dieser Untersuchung konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Gesamtverfügbarkeit in den unterschiedlichen Stämmen unterschiedlich ist. Möglicherweise ist die Konzentration im Serum ähnlich aber die Konzentration auf der Oberfläche von Gelenken und anderen Organen unterschiedlich.

Bei den bisher diskutierten Daten wurde die Arthritisinduktion in den DBA/1 Mäusen immer mit heterologer G6PI durchgeführt. Obwohl die humane und die murine G6PI starke Ähnlichkeiten aufweisen, unterscheiden sie sich jedoch zu 10% in ihrer Sequenz. Das könnte zur Konsequenz haben, dass die Epitope, die den T-Zellen präsentiert werden zwischen Mensch und Maus unterschiedlich sind, so dass keine Selektion gegen diese T-Zellen im Thymus stattgefunden hat. Auch in der CIA können in einigen Ratten- und Mausstämmen die Tiere mit autologem Kollagen II immunisiert werden und entwickeln dann eine Arthritis. Im Gegensatz zur Immunisierung mit heterologem CII entwickeln die Tiere jedoch erst 4- 12 Wochen nach Immunisierung eine Arthritis und zeigen zudem einen chronischen Verlauf (Boissier et al. (1987), Holmdahl et al. (1986)). In der G6PI-induzierten Arthritis wurden DBA/1 Tiere mit muriner G6PI immunisiert (Kap. 4.2.6). Der klinische Verlauf der Arthritis stimmte mit den human G6PI immunisierten Tieren bei leicht reduzierter Inzidenz überein. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Tiere männlichen oder weiblichen Geschlechts waren. In der CIA erkrankten weibliche DBA/1 Mäuse mit geringer Inzidenz und mit weitaus milderem Verlauf als die männlichen Tiere (Boissier et al. (1987)). Damit unterscheidet sich das G6PI-induzierte Modell von der CIA, da die DBA/1 Mäuse keinen chronischen Verlauf der Erkrankung zeigen und auch nicht erst viel später erkranken. Die etwas geringere Inzidenz macht deutlich, dass es mit der autologen G6PI scheinbar schwieriger ist, die Toleranz gegenüber der G6PI zu überwinden und eine Arthritis zu induzieren. Der Verlauf nach Induktion der Arthritis mit muriner G6PI lässt die Frage zu, warum die Tiere keine chronische Arthritis entwickeln. Im Serum der Maus lässt sich lösliches G6PI feststellen und jede Zelle enthält viel G6PI. Das bedeutet, dass das Antigen stets zur Verfügung steht. Weiterhin lässt sich durch die Immunisierung mit muriner G6PI zeigen, dass eine erhöhte Frequenz autoreaktiver Zellen vorhanden ist, die zur Entwicklung einer Arthritis bei 80% der Mäuse ausreicht. Wenn also die Vorläuferfrequenz autoreaktiver Zellen und das Antigen frei verfügbar ist, so muss ein weiterer Faktor eine wichtige Rolle bei der Induktion der Arthritis spielen. Das könnte z.B. das Adjuvans sein bzw. bakterielle Rückstände, die in der G6PI-Präparation vorhanden sind. Tatsächlich ist schon seit langem bekannt, dass durch die Immunisierung von Ratten mit komplettem Freundschens Adjuvans eine Arthritis induziert werden kann Pearson (1956). Es ist auch bekannt, dass Adjuvantien in Form kleiner Moleküle, die keine antigenen Epitope ausbilden können, eine Arthritis in bestimmten Rattenstämmen auslösen können (Chang et al. (1980), Kohashi et al. (1982)). Somit ist der immunogene Effekt des Adjuvans möglicherweise in der Lage die ausgebildete Toleranz gegen ein Antigen, welches eine Arthritis zu induzieren vermag, zu überwinden. Dies kann möglicherweise auch passieren, wenn die Tiere altern

und selbst nicht mehr in der Lage sind die Toleranz aufrechtzuerhalten. Eine Studie zeigt, dass alternde männliche DBA/1 Mäuse in 80% der Tiere eine chronische entzündliche Arthritis entwickeln (Nordling et al. (1992)). Ob in diesen Tieren G6PI eine Rolle als Autoantigen spielt, ist bisher nicht untersucht worden. Klar ist, dass die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis abhängig ist vom Antigen, da DBA/1 Mäuse, die nur mit PBS in CFA immunisiert wurden, keine Arthritis entwickelten.

Die in dieser Arbeit verwendete humane und murine G6PI wurde rekombinant in Bakterien hergestellt. Es ist daher von großer Bedeutung herauszufinden, ob bakterielle Rückstände in der Präparation und die Modifikation der G6PI einen Einfluss auf die Arthritisentwicklung haben. Sowohl die rekombinante humane als auch die murine G6PI wurden N-terminal mit einer sechsfachen Histidinmarkierung versehen, die zur Aufreinigung über eine Ni-NTA Säule benötigt wurde. Es ist bekannt, dass kationische Antigene mit Strukturen des Gelenks interagieren können und Einfluss auf die Entwicklung z.B. bei der Antigen induzierten Arthritis nehmen können. Eine chronische Arthritis in den Gelenken entwickelt sich nur bei der intraartikulären Injektion von kationischem BSA, nicht aber bei herkömmlichen BSA (van den Berg et al. (1984)). Außerdem ist durchaus denkbar, dass eine Immunreaktion auch gegen die Histidinmarkierung gerichtet sein kann. DBA/1 Mäuse wurden mit kommerziellem Kaninchen G6PI immunisiert, welches aus dem Muskel von Kaninchen stammt und keine bakteriellen Rückstände enthält. Außerdem war diese G6PI nicht modifiziert, so dass keine pH-abhängigen Effekte bzw. immunodominanten Effekte durch die Histidinmodifikation vorhanden waren. Die Homologie zwischen der Kaninchen G6PI und der humanen bzw. murinen G6PI liegt bei über 90%. Ein Nachteil dieser Präparation ist jedoch, dass sie durch andere Proteine kontaminiert ist. Einige dieser kontaminierenden Proteine, z.B. die Fruktose-1,6-bisphosphatase und die M-Kette der Kreatinkinase, erwiesen sich jedoch als nicht arthritogen (Schmitt A. und Marschinke F., unveröffentlichte Beobachtungen). Mit Hilfe der Kaninchen G6PI konnte in DBA/1 Mäusen eine Arthritis induziert werden (Kap. 4.2.8). Auch wenn die Präparation mit einigen Proteinen verunreinigt war, kann davon ausgegangen werden, dass der arthritogene Effekt auf der in der Präparation vorhandenen G6PI zurückzuführen ist. Die G6PI ist in dieser Präparation die am stärksten konzentrierteste Fraktion und zwei andere prominent vorhandene Kontaminationen haben sich als nicht arthritogen herausgestellt. Unabhängig von der Reinheit der Präparation wurde durch diese Experimente jedoch deutlich, dass bakterielle Rückstände und auch die Histidinmarkierung keinerlei Einfluss auf die Entwicklung der Arthritis hatten.

5.2.4 Die Rolle der Antikörper und des Komplementsystems in der G6PI-induzierten Arthritis

Im CIA-Modell ist die Bildung von Autoantikörpern gegen murines CII wahrscheinlich der primäre Mechanismus in der Immunpathogenese. Der Transfer von Serum arthritischer Mäuse oder Ratten in naive Empfängertiere induziert eine schwere Entzündung in den Empfängern (Englert et al. (1986), Holmdahl et al. (1990), Stuart et al. (1982)). Auch im K/BxN-Modell spielen B-Zellen und Antikörper eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese (Korganow et al. (1999), Matsumoto et al. (1999)). Durch Transfer von Serum oder monoklonalen Antikörpern vom IgG₁ Isotyp kann in den Empfängermäusen eine Arthritis induziert werden, die allerdings nicht chronisch verläuft. Sobald im K/BxN-Modell genügend Antikörper gegen G6PI gebildet wurden, sind die T-Zellen nicht mehr notwendig. Da gerade im K/BxN-Modell die Antikörper wichtig sind, wurde die Produktion von anti-G6PI Antikörpern auch im G6PI-induzierten Arthritismodell untersucht (Kap. 4.3.1). Beginnend von Tag 6 nach Immunisierung mit rekombinanter humaner G6PI können hohe Titer gegen rekombinante humane und murine G6PI detektiert werden. Das bedeutet, dass die Antikörper kreuzreaktiv zwischen humaner und muriner G6PI sind. Die niedrigeren Titer gegen murine G6PI sind durchaus erwartet. Zwar besteht zwischen humaner und muriner G6PI eine starke Homologie, und auch die 3-dimensionale Struktur ist zwischen den unterschiedlichen Spezies fast identisch (Graham Solomons et al. (2004)). Dennoch existieren sowohl lineare und wahrscheinlich auch konformationelle Epitope, die zwischen Mensch und Maus unterschiedlich sind, weshalb mehr Antikörper gegen humane G6PI gebildet werden. Geht man davon aus, dass die pathologische Relevanz der Antikörper in der Erkennung der murinen G6PI besteht, so kann durch diese Experimente gleichzeitig auch gezeigt werden, dass Antikörper gegen G6PI nicht ausschließlich verantwortlich sein können für die Arthritis in DBA/1 Mäusen. Nach 30 Tagen können immer noch hohe Antikörpertiter sowohl gegen murine als auch gegen humane G6PI gemessen werden, obwohl die Arthritis schon zurückgegangen ist. Damit unterscheidet sich das G6PI-induzierte Modell stark vom K/BxN-Modell. Haben sich dort erst einmal Antikörper gegen G6PI gebildet, so verläuft die Arthritis chronisch und ist nicht mehr abhängig von anderen Faktoren wie z.B. T-Zellen (Kouskoff et al. (1996)). Ein weiterer Punkt, der gegen die Beteiligung von Antikörpern und B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis spricht, ist der Fakt, dass der Transfer großer Mengen aufgereinigter IgG nicht in der Lage ist, eine Arthritis in den Empfängermäusen auszulösen (Kap. 4.3.4). Sowohl im CIA-Modell als auch im K/BxN-Modell ist dies möglich.. Man könnte auch die Hypothese aufstellen, dass die gespritzte humane G6PI das eigentliche Ziel der Immunantwort ist, die zur Arthritis führt. Unter

der Annahme, dass sich gewisse Anteile der gespritzten G6PI im Gelenk ablagern, könnten sich dort Immunkomplexe bilden, die dann zur Zerstörung des Gewebes führen. Eine Abnahme der Arthritis trotz hoher Antikörpertiter könnte dann durch das Fehlen des Antigens erklärt werden. Weiterhin könnte damit auch erklärt werden, warum der Arthritistransfer durch Transfer der Antikörper im G6PI-induziertem Modell nicht funktioniert, da das Zielantigen gar nicht vorhanden ist. Wenn spekuliert wird, ob Antikörper eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis spielen, dann ist natürlich auch die Frage, welche Antikörpertiter die Stämme entwickeln, die nicht-suszeptibel für die G6PI-induzierte Arthritis sind. Die Experimente zeigen, dass alle untersuchten Stämme sowohl gegen murine als auch gegen humane G6PI hohe Antikörpertiter entwickeln (Kap. 4.3.1). Dieser Befund spricht erneut deutlich gegen eine Beteiligung der Antikörper. Jedoch kann auch im CIA-Modell die gleiche Beobachtung gemacht werden. Obwohl hier Antikörper eindeutig pathologisch relevant sind, entwickeln auch nicht-suszeptible Stämme hohe Titer gegen CII (Wooley et al. (1981)). Möglicherweise ist die Qualität der Antikörper in den unterschiedlichen Stämmen unterschiedlich. Es könnte durchaus sein, dass in DBA/1 Mäusen Antikörper gebildet werden, die gegen frei zugängliche Epitope gerichtet sind und daher im Gelenk Immunkomplexe bilden können. Da bisher nicht bekannt ist, wie sich G6PI im Gelenk anlagert, könnten Epitope, die von Antikörpern anderer Stämme erkannt werden, nicht frei zugänglich sein und somit die Bildung von Immunkomplexen verhindern. Ein anderer wichtiger Punkt sind auch die Isotypen der gebildeten Antikörper gegen G6PI. Sowohl im K/BxN-Modell als auch im CIA-Modell spielen die Isotypen der Antikörper eine wichtige Rolle. Im K/BxN-Modell sind es anti-G6PI Antikörper der IgG₁ Subklasse, die in der Lage sind, die Arthritis zu transferieren (Maccioni et al. (2002)). In der CIA sind es vor allem Antikörper der IgG2 Subklasse, die eine Rolle spielen (Terato et al. (1992), Watson und Townes (1985)). In DBA/1 Mäusen konnten von allen Subklassen der anti-G6PI-IgG Antikörper hohe Konzentrationen gemessen werden (Kap. 4.3.2). Beim Vergleich der Antikörpertiter zwischen dem DBA/1 Stamm und den anderen Stämmen fällt auf, dass die anderen Stämme deutlich höhere Titer gegen humane und murine G6PI entwickelten. Die Bestimmung der Antikörpertiter in den DBA/1 Mäusen wurde jedoch mit einem anderen ELISA Verfahren durchgeführt, bei der die Bindung der IgG Antikörper an G6PI mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase detektiert wurde. Die Detektion in den anderen Stämmen wurde mit einem Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper durchgeführt. Dabei entwickelte sich gerade mit dem biotinylierten Sekundärantikörper ein hohes Hintergrundsignal, welches zu den geringeren Titern führte. Die Antikörpertiter sind daher nicht direkt vergleichbar. Die

bisher diskutierten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Antikörper möglicherweise keine entscheidende Rolle spielen. Bis jetzt wurde nur die Produktion der Antikörper untersucht und nicht deren mögliche Effektorfunktion. Eine wichtige Funktion von Antikörpern ist zum Beispiel die positive und negative Regulation von Immunantworten durch das Binden an Fc-Rezeptoren. Die Bindung führt zur Proliferation von B-Zellen, zur Phagozytose bei Makrophagen und zur Degranulation bei Mastzellen. Über Fc-Rezeptoren werden auch Immunkomplexe aufgenommen und deren gebundenen Antigene anschließend präsentiert (Amigorena et al. (1998), Hamano et al. (2000)). Viele von Antikörpern vermittelte Funktionen werden von Effektorzellen ausgeübt, die über Fc-Rezeptoren verfügen. Der Einfluss der Fc-Rezeptoren auf die G6PI-induzierte Arthritis wurde daher untersucht (Kap. 4.3.5). Es konnte gezeigt werden, dass DBA/1 Mäuse, die keine aktivierenden Fc γ RI und Fc γ RIII exprimieren konnten, eine Arthritis mit geringer Inzidenz und mildem Verlauf entwickelten. DBA/1 Mäuse dagegen, die kein Fc γ RIIB exprimierten, zeigten eine erhöhte Inzidenz von 100% und einen chronischen Verlauf. Beide Stämme entwickeln dabei hohe anti-G6PI Titer. Damit ist ganz deutlich, dass auch in der G6PI-induzierten Arthritis den über die Fc-Rezeptoren vermittelten Funktion der Antikörper eine große Bedeutung zukommt. Da die bisher einzig bekannte extrazelluläre Funktion der Fc-Rezeptoren die Bindung von Antikörpern ist, konnte indirekt bewiesen werden, dass Antikörper eine wichtige Rolle spielen. Im CIA-Modell konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. DBA/1 Mäuse, die defizient für die gemeinsame γ -Kette sind, sind resistent gegen CIA, obwohl sie hohe Antikörpertiter gegen CII entwickeln (Kleinau et al. (2000)). Die Verwendung von Fc γ RIIB^{-/-} DBA/1 Mäusen dagegen führte zu einem schwereren Verlauf der Arthritis (Kleinau et al. (2000)). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein nicht-suszeptibler Mausstamm eine CIA entwickelt, wenn Fc γ RIIB fehlt (Yuasa et al. (1999)). Auch im K/BxN-Modell konnte in unterschiedlichen Stämmen mit genetischen Deletionen für Fc γ -Rezeptoren gezeigt werden, dass sowohl der aktivierende Fc γ RI als auch der inhibierende Fc γ RIIB keine Rolle bei der Induktion oder im Verlauf der Arthritis spielen, während der Fc γ RIII, der auch über IgG₁ aktiviert werden kann, sehr wichtig ist (Ji et al. (2002a)). Damit konnte in allen drei Modellen gezeigt werden, dass den gebildeten Antikörpern und ihren über Fc γ -Rezeptoren vermittelten Funktionen ein großer Anteil bei der Induktion der Arthritis zukommt. In der Zukunft ist eine wichtige Frage, ob die entscheidenden Antikörper tatsächlich auch eine Spezifität für G6PI besitzen müssen und es sich hierbei um einen immunkomplexvermittelten Prozess handelt. Weiterhin muss untersucht werden, welcher der aktivierenden Fc-Rezeptoren wichtig ist, da die Aktivierung über Fc γ RI oder Fc γ RIII unterschiedliche Immunantworten nach sich zieht. Neue Erkenntnisse

könnten möglicherweise monoklonale Antikörper liefern, die aus arthritischen Mäusen nach G6PI Immunisierung generiert wurden. Mit Hilfe dieser Antikörper ist es möglich, die Epitope zu identifizieren, die von diesen Antikörpern gebunden werden. Im K/BxN-Modell wurden zwei lineare Epitope identifiziert. Antikörper, die diese Epitope erkennen, können die Arthritis transferieren (Solomon (2003)). Ein Vergleich der Epitope könnte Aufschluss geben, warum der Transfer in der G6PI-induzierten Arthritis nicht funktioniert. Außerdem ist interessant, ob die nicht-suszeptiblen Stämme andere Epitope erkennen als die DBA/1 Mäuse. Sowohl im CIA-Modell als auch im K/BxN-Modell ist der Transfer nur möglich, wenn mindestens zwei Antikörper unterschiedlicher Spezifität das Antigen binden (Maccioni et al. (2002), Terato et al. (1992)), was impliziert, dass Immunkomplexe von Bedeutung sind. Die nicht-suszeptiblen Stämme entwickeln hohe Antikörpertiter gegen G6PI. Möglicherweise sind die Epitope jedoch so angeordnet, dass keine Immunkomplexe ausgebildet werden können. Neben der Bestimmung der Epitope spielt sicherlich auch die Affinität der Antikörper eine Rolle. Im K/BxN-Modell wurden monoklonale Antikörper generiert und deren Affinität über Plasmon Resonanz Messungen bestimmt (Maccioni et al. (2002)). Hier wird interessant sein, ob die Antikörper aus den DBA/1 Mäusen möglicherweise andere Affinitäten aufweisen als im K/BxN-Modell. Dies ist sogar sehr wahrscheinlich, da im K/BxN-Modell die B-Zellen aufgrund des transgenen T-Zellrezeptors starke B-Zellhilfe erhalten und somit einer massiven Affinitätsreifung unterzogen werden. Möglicherweise kann die Arthritis im G6PI-induzierten Modell nicht mit Antikörpern transferiert werden, weil die Affinität der Antikörper zu gering ist.

Ein weiterer Mechanismus, bei dem eine Verbindung zwischen der angeborenen und der humoralen Immunität hergestellt wird, ist das Komplementsystem. Ein mögliches Modell der Arthritisinduktion könnte so funktionieren, dass kreuzreaktive Antikörper gegen murine G6PI im Gelenk Immunkomplexe bilden. Durch diese Immunkomplexe wird das Komplementsystem aktiviert, welches seinerseits das Gewebe zerstört und andere Zellen des Immunsystems in das Gelenks lockt, die dann, z.B. über die Bindung von Antikörper an Fc-Rezeptoren, aktiviert werden. Auch bei der Pathogenese der RA wird dem Komplement eine große Bedeutung zugeschrieben (Jose et al. (1990), Morgan et al. (1988), Ward und Zvaifler (1971)). Dabei spielen wahrscheinlich der klassische und der alternative Weg der Komplementkaskade eine Rolle (Brodeur et al. (1991)). Um zu untersuchen, ob das Komplementsystem eine Rolle bei der Pathogenese in der G6PI-induzierten Arthritis spielt, wurde das zentrale Protein der Komplementkaskade C5 mit Hilfe des anti-C5 Antikörpers BB5.1 inhibiert (Frei et al. (1987)). Die mit BB5.1 behandelten Tiere entwickelten eine Arthritis mit einer Inzidenz von nur 66% und

einem verzögerten milderen Verlauf der Arthritis, obwohl die Aktivität des Komplementsystems im hämolytischen Test nur zu ca. 30 % eingeschränkt war (Kap. 4.3.6). Daraus kann geschlossen werden, dass die Komplementaktivität einen zentralen Mechanismus in der G6PI-induzierten Arthritis darstellt. Das G6PI-induzierte Arthritismodell weist in dieser Hinsicht Parallelen zur CIA und zum K/BxN-Modell auf (Ji et al. (2002a), Wang et al. (1995)). Durch gänzliche Blockade des Komplements, z.B. in einer C5-ko Maus, könnte die Arthritisentwicklung möglicherweise vollständig verhindert werden. Ein Nachteil an diesem Experiment ist jedoch, dass nicht klar ist, welcher Weg des Komplements aktiviert wird, da alle Wege im zentralen Molekül C5 münden. Aus den bisher bekannten Daten kann spekuliert werden, welcher Weg eine große Rolle spielen könnte. DBA/1 Mäuse verfügen zu dem Zeitpunkt an dem sie erkranken über alle IgG Subklassen. Die Subklasse, die zuerst gemessen werden kann, ist erwartungsgemäß IgG₁. IgG₁ interagiert aber nur schwach mit C1q, so dass der klassische Weg der Komplementkaskade von dieser Subklasse kaum aktiviert werden kann. Im K/BxN-Modell sind IgG₁ Antikörper der vorherrschende Isotyp und der alternative Weg der Komplementkaskade ist von Bedeutung. IgG₁ könnte durch Bindung an C3b, einer Komponente des alternativen Weges, die Inaktivierung von C3b durch den Faktor H verhindern (Ji et al. (2002a), Klaus et al. (1979)). Es ist also durchaus vorstellbar, dass die gegen G6PI gebildeten Antikörper der IgG₁ Subklasse in der G6PI-induzierten Arthritis bei der Aktivierung des alternativen Weges der Komplementkaskade eine Rolle spielen. Interessanterweise erkranken die Tiere dann, wenn auch die IgG₂ Subklasse im Serum detektierbar ist. Die IgG₂ Subklassen sind in der Lage, an C1q, dem ersten Komplex des klassischen Weges der Komplementkaskade, zu binden und die Komplementkaskade zu aktivieren (Duncan und Winter (1988)). DBA/1 Mäuse, die defizient für C3, einem Protein des klassischen Weges der Komplementkaskade, aber auch für den Faktor B, einem Protein des alternativen Weges der Komplementkaskade, sind resistent gegen die CIA (Hietala et al. (2002)). Das zeigt, dass in der CIA der alternative und der klassische Weg der Komplementkaskade eine Rolle in Abhängigkeit der IgG₂ Subklasse spielen. In der G6PI-induzierten Arthritis sind alle IgG-Subklassen vorhanden und es kann spekuliert werden, dass diese Antikörper sowohl an der Aktivierung des klassischen Weges als auch des alternativen Weges der Komplementkaskade beteiligt sind.

Zusammenfassend ist in der G6PI-induzierten Arthritis deutlich geworden, dass Antikörper ganz entscheidend zur Pathogenese beitragen. Die von Antikörpern über Fcγ-Rezeptoren übermittelten Signale auf Effektorzellen und auch die Aktivierung bzw. Verstärkung der Komplementkaskade durch die gebildeten Antikörper sind dabei die entscheidenden Funktionen. Damit konnten in diesem Modell Effektormechanismen aufgezeigt werden, die auch bei der

Pathogenese von RA ein wichtige Rolle spielen. Das G6PI-induzierte Arthritismodell eignet sich daher sehr gut dafür, immunmodulatorische Therapeutika, die z.B. gegen Komponenten des Komplementsystem aber auch als Antagonisten für Fc γ -Rezeptoren entwickelt wurden, zu testen.

5.2.5 Die Rolle der T-Zellen und der von ihnen produzierten Zytokine in der G6PI-induzierten Arthritis

Sowohl bei der RA als auch im Tiermodell spielen CD4⁺ T-Zellen eine große Rolle. Im K/BxN-Modell sind die transgenen T-Zellen für die Induktion der Arthritis notwendig (Kouskoff et al. (1996), Mangialaio et al. (1999)). Auch in der CIA haben CD4⁺ T-Zellen eine immense Bedeutung. Sie leisten dort B-Zellhilfe, um arthritogene Antikörper zu produzieren (Corthay et al. (1999)). Außerdem wird vermutet, dass sie selbst eine aktive Rolle bei der Gelenkentzündung spielen, indem sie andere Zellen, wie z.B. Makrophagen, aktivieren (Holmdahl et al. (2002)). Klares Indiz für die wichtige Rolle der CD4⁺ T-Zellen bei der CIA ist auch hier die MHC Assoziation. Trotz dieser Studien bleibt die Rolle der CD4⁺-T-Zellen kontrovers, da auch CD4^{-/-} Mäuse, eine Arthritis nach Immunisierung mit heterologem CII entwickeln (Tada et al. (1996)). Um die Rolle der CD4⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis näher zu untersuchen, wurde versucht, autoreaktive CD4⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit G6PI zu restimulieren und die Proliferation über den Einbau von ³H-Thymidin zu verfolgen. Bei allen untersuchten Stämmen konnte nur in den Zellen der drainierenden Lymphknoten der DBA/1 Mäuse zwischen den Tagen 9 und 12 eine Proliferation gemessen werden (Kap. 4.4.1). Damit wird deutlich, dass die nicht-suszeptiblen Stämme nicht in der Lage sind, mit einer CD4⁺ T-Zellantwort auf die Immunisierung mit G6PI zu reagieren. Dadurch kann z.B. die B-Zellhilfe nur eingeschränkt funktionieren. Zwar werden auch hohe Titer in diesen Mäusen produziert, es ist aber nicht klar, ob sie auch die gleiche Spezifität und Affinität haben. Fehlt nun diese spezifische CD4⁺-T-Zellantwort nach Immunisierung mit G6PI, so können diese T-Zellen nicht in das Gelenk migrieren, um dort ihre Effektorfunktion auszuüben. Die Antikörper alleine reichen dann nicht aus, um eine Arthritis zu induzieren. Obwohl die DBA/1 Mäuse hohe Titer gegen G6PI entwickeln, nimmt die Arthritis nachdem keine CD4⁺ T-Zellantwort mehr gemessen werden kann wieder ab (Kap. 4.2.2 und Kap. 4.4.1). Diese Daten sind erste Hinweise darauf, dass auch in der G6PI-induzierten Arthritis CD4⁺-T-Zellen entscheidend für die Entwicklung der Arthritis sind. Ein weiterer Punkt, der sehr interessant ist, ist der Fakt, dass auch die CD4⁺ T-Zellen der SWR und B10.Q Mäuse nicht proliferieren. Da beide Stämme über das gleiche MHC-II Protein verfügen wie die

DBA/1 Mäuse, müsste den T-Zellen auch das oder die gleichen Epitope präsentiert werden, und es sollte eigentlich mit einer $CD4^+$ -T-Zellantwort gerechnet werden. Diese konnte nicht gemessen werden und dafür kann es mehrere Gründe geben. Die B10.Q Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen und sind aufgrund einer Mutation resistent gegen die CIA (Shaw et al. (2003)). Diese Mutation könnte auch Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten der $CD4^+$ -T-Zellen haben. Der SWR Stamm hat einen T-Zelldefekt, da ihm ca. 50% des V_β Gens fehlt (Behlke et al. (1986)). Auch das könnte sich auf das Proliferationsverhalten der $CD4^+$ T-Zellen auswirken, da möglicherweise das T-Zellrepertoire beschränkt ist. Abgesehen davon könnten aber auch noch zwei andere Aspekte eine wichtige Rolle spielen, die im übrigen auch für die anderen nicht-suszeptiblen Stämme gelten. Der erste Aspekt beinhaltet die Mechanismen der zentralen Toleranz, also die positive und negative Selektion G6PI spezifischer $CD4^+$ T-Zellen im Thymus. Unter Umständen ist die Frage der Suszeptibilität damit verknüpft, ob die meisten G6PI spezifischen autoreaktiven $CD4^+$ T-Zellen im Thymus deletiert werden können oder nicht. Es wäre daher interessant, das H2-q restringierte Epitop zu bestimmen und zu untersuchen, ob noch andere H2-q kongene Stämme existieren, die suszeptibel sind oder nicht. Mit Hilfe von MHC-II spezifischen Tetrameren kann dann nachgewiesen werden, wie viele autoreaktive $CD4^+$ -T-Zellen die Peripherie erreichen und wie die Selektion im Thymus reguliert wird. Möglicherweise existiert in den DBA/1 Mäusen ein Defekt, der es vielen autoreaktiven $CD4^+$ -T-Zellen, sei es mit Spezifität für CII oder G6PI, erlaubt, den Thymus zu verlassen. Ein anderer Aspekt ist die periphere Toleranz. Auch wenn es autoreaktiven $CD4^+$ -T-Zellen aller Stämme gelingen sollte, die Peripherie zu erreichen, könnten sogenannte regulatorische $CD4^+CD25^+$ T-Zellen eine $CD4^+$ T-Zellantwort gegen G6PI unterdrücken. Die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen wurde zusätzlich auch mit CFDA-SE nachgewiesen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die $CD4^+$ -T-Zellen nicht proliferieren, wenn die Mäuse nur mit PBS in CFA immunisiert wurden und anschließend mit muriner oder humaner G6PI restimuliert wurden (Kap. 4.4.2). Das ist ein wichtiger Punkt, da gezeigt werden konnte, dass G6PI über den möglicherweise exprimierten AMF-Rezeptor nicht als Mitogen auf $CD4^+$ T-Zellen wirkt. Somit beruht die gemessene Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen nach Immunisierung und Restimulation mit G6PI tatsächlich auf eine spezifische $CD4^+$ T-Zellantwort. Nach Immunisierung mit humaner G6PI proliferierten die $CD4^+$ T-Zellen an Tag 11, ohne dass es der Zugabe von Antigen bedarf. Diese Beobachtung ist nicht ungewöhnlich, da zu diesem Zeitpunkt die G6PI spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen wahrscheinlich in den drainierenden Lymphknoten selbst massiv G6PI von den APC präsentiert bekommen und proliferieren. Unter Zugabe von humaner G6PI wird die Proliferation *in vitro* noch verstärkt. Die Zugabe von muri-

ner G6PI lässt die $CD4^+$ T-Zellen nur unwesentlich stärker proliferieren als ohne Zugabe von Antigen. Das könnte bedeuten, dass die G6PI spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen nicht kreuzreaktiv zwischen humaner und muriner G6PI sind. Auch in der CIA kann beobachtet werden, dass die $CD4^+$ -T-Zellantwort vor allem gegen das heterologe CII gerichtet ist und nur eine schwache Antwort gegen das autologe CII messbar ist (Andersson und Holmdahl (1990)). Das könnte auch eine Erklärung sein, warum die Arthritis nach der maximalen $CD4^+$ T-Zellantwort wieder abnimmt. Da keine $CD4^+$ T-Zellen aktiviert werden, die auch auf die murine G6PI antworten, kann die Immunantwort gegen G6PI nicht aufrechterhalten werden, wenn die Antwort gegen die humane G6PI abgeklungen ist. Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Arthritis auch mit muriner G6PI induziert werden kann. Dies spricht eindeutig für das Vorhandensein autoreaktiver $CD4^+$ T-Zellen, die auch gegen murine G6PI gerichtet sind. Wahrscheinlich sind Suppressormechanismen in der Peripherie für die geringe $CD4^+$ T-Zellantwort gegen murine G6PI verantwortlich.

Die gemessene Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen nach Restimulation mit humaner G6PI beweist aber noch nicht, dass diese $CD4^+$ T-Zellen tatsächlich auch eine Rolle bei der Pathogenese in der G6PI-induzierten Arthritis spielen. Durch die Depletion von $CD4^+$ Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor oder nach Immunisierung mit humaner G6PI mit Hilfe des depletierenden anti- $CD4$ Antikörper YTS191.1 (Cobbald et al. (1990)) konnte dies bewiesen werden. Eine Depletion vor den ersten klinischen Zeichen der Arthritis verhindert die Entwicklung der Arthritis fast vollständig (Kap. 4.4.6). Die $CD4^+$ -T-Zellen sind also maßgeblich an der Induktion der Arthritis beteiligt und ähneln in diesem Aspekt der CIA und dem K/BxN-Modell (Hom et al. (1988), Kouskoff et al. (1996), Mangialaio et al. (1999), Ranges et al. (1985)). Eine Depletion vor Immunisierung mit G6PI verhindert die Antikörperproduktion fast völlig gegen humane und gänzlich gegen murine G6PI. Somit konnte hier auch gezeigt werden, dass die gebildeten Autoantikörper gegen G6PI abhängig von der T-Zellantwort sind. Somit ist ähnlich wie im K/BxN und auch im CIA Modell eine zentrale Funktion der $CD4^+$ T-Zellen die B-Zellhilfe bei der Generierung von Autoantikörpern. Bei einer Depletion zu einem späteren Zeitpunkt an den Tagen 6 und 9 entwickeln die Tiere keine Arthritis aber genauso hohe Titer gegen humane und murine G6PI wie die Kontrolltiere. Dadurch wird noch einmal deutlich, dass Antikörper alleine nicht in der Lage sind, eine Arthritis zu induzieren. Dieser Effekt wird besonders dann deutlich, wenn die $CD4^+$ T-Zellen zu einem Zeitpunkt depletiert werden, wo die Arthritis voll etabliert ist. Nach der Depletion an den Tagen 11 und 14 nimmt der Schweregrad der Arthritis sofort ab und die Mäuse werden sehr schnell wieder gesund. $CD4^+$ T-Zellen werden daher nicht nur für die Induktionsphase sondern auch in der Effek-

torphase zur Aufrechterhaltung der Arthritis benötigt. Damit unterscheidet sich das G6PI-induzierte Modell maßgeblich vom K/BxN-Modell und auch von der CIA, wo $CD4^+$ T-Zellen in der Effektorphase keine Rolle mehr spielen (Kouskoff et al. (1996), Williams und Whyte (1996)). Neben ihrer Funktion in Form der B-Zellhilfe müssen die $CD4^+$ T-Zellen auch noch andere Funktionen wahrnehmen. Diese Funktionen könnten in erster Linie durch die von den $CD4^+$ -T-Zellen produzierten Zytokine vermittelt werden. In dieser Arbeit wurde die Expression von Zytokinen in $CD4^+$ T-Zellen an den Tagen 6,9 und 11 nach Immunisierung und Restimulation mit humaner G6PI gemessen (Kap 4.4.3). Dabei wurde von den $CD4^+$ Zellen der drainierenden inguinalen Lymphknoten TNF- α , IL-6 und IL-17 exprimiert, während die $CD4^+$ Zellen der Milz hpts. TNF- α und viel IL-6 und nur wenig IL-17 produzierten. Daneben exprimierten einige wenige $CD4^+$ Zellen auch IL-4, IL-2 und IFN- γ . Die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-17 sind schon häufiger in Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen in Erscheinung getreten. TNF- α ist ein äußerst wirksames pro-inflammatorisches Zytokin, welches in einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen eine große Rolle spielt (Vassalli (1992)). Durch Neutralisierung von TNF- α mit Hilfe von Antikörpern kann in der CIA eine deutliche Verbesserung des klinischen Verlaufs hervorgerufen werden (Williams et al. (1992)). Bei Patienten mit RA werden seit kurzer Zeit erfolgreich ein löslicher TNF-Rezeptor (Enbrel®) oder Antikörper gegen TNF- α (Remicade®) in der Therapie eingesetzt (Olsen und Stein (2004)). Möglicherweise ist auch in der G6PI-induzierten Arthritis das Zusammenspiel dieser von den $CD4^+$ -T-Zellen exprimierten Zytokinen entscheidend für die Entwicklung der Arthritis. Die wichtige Rolle des TNF- α rührt unter anderem daher, dass TNF- α von vielen Zelltypen, wie z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen, polymorphkernigen Leukozyten und wahrscheinlich noch vielen anderen Zelltypen exprimiert und ausgeschüttet werden kann. Neben der Ausschüttung durch viele Zelltypen vermittelt TNF- α auch viele Funktionen. Unter anderem zählen dazu die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen, eine verstärkte Antwort von aktivierten T-Zellen, durch verstärkte Expression des IL-2 Rezeptors, möglicherweise auch das Wachstum und die Reifung von B-Zellen. TNF- α induziert die Freisetzung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Zytokine und wirkt zusätzlich chemotaktisch. Es induziert oder verstärkt die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ELAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 und führt zu einer verstärkten Expression von MHC-Proteinen (Vassalli (1992)). Gerade in Hinblick auf entzündliche Reaktionen im Gelenk sind unter dem Einfluss von TNF- α eine verstärkte Synthese von Kollagenase in synovialen Zellen, eine verstärkte Resorption von Proteoglykanen und die Inhibition ihrer Synthese, sowie die Knochenresorption durch Osteoklasten und die Inhibition der Knochenbildung zu beobachten (Beutler

und Cerami (1989)). TNF- α könnte in der G6PI-induzierten Arthritis also dazu beitragen, andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren, was z.B. auch zu einer verstärkten Fc-Rezeptor Expression auf Makrophagen führen könnte, die für die Bindung von Immunkomplexen verantwortlich sein könnte. Gleichzeitig könnte es aufgrund seiner chemotaktischen Eigenschaften zusätzliche Zellen an den Entzündungsherd locken und aktivieren. Im Gelenk selbst könnte es aufgrund seiner oben beschriebenen Eigenschaften die Regeneration von Knochen und Knorpel inhibieren. Durch die Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen können zusätzlich Zellen in das Gelenk einwandern. Um die Rolle von TNF- α genauer zu untersuchen, wurden DBA/1 Mäuse direkt nach Immunisierung mit humaner G6PI mit unterschiedlichen Mengen Etanercept, einem dimeren löslichen TNF-Rezeptor, der TNF- α blockiert, behandelt (Kap. 4.4.4). Dabei konnte beobachtet werden, dass durch die Behandlung mit Etanercept nur 30% der Tiere eine Arthritis entwickeln, wenn sie mit 100 μ g behandelt wurden, aber 70%, wenn sie mit 30 μ g behandelt wurden. Das zeigt, dass TNF- α massiv an der Induktion beteiligt ist und eine große Menge als Antwort auf die G6PI-Immunisierung freigesetzt wird. Eine tägliche Gabe von 30 μ g Etanercept reicht dabei scheinbar kaum aus, um die TNF- α Effekte aufzuheben. Die Dosis von 30 μ g ist vielleicht auch deswegen zu niedrig, da die Tiere den Rezeptor möglicherweise so schnell verstoffwechseln, dass in der Maus nie eine Konzentration erreicht wird, welche die Funktion von TNF- α vollständig blockieren kann. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Therapie bei einer bereits entwickelten Arthritis so gut wie keine Effekte zeigt. Das bedeutet, dass die durch TNF- α vermittelten Effekte zwar bei der Induktion eine wichtige Rolle spielen, zur Aufrechterhaltung der Erkrankung dagegen aber nur wenig beitragen. Damit unterscheidet sich die G6PI-induzierte Arthritis von der humanen RA, wo nur ein kleiner Anteil der Patienten nicht auf die Therapie mit Etanercept anspricht. Möglicherweise sind die Gründe dafür in der G6PI-induzierten Arthritis und bei diesen Patienten die gleichen, so dass mit Hilfe des G6PI-induzierten Arthritismodells neue therapeutische Ansätze gefunden werden können, z.B. durch die Blockade von IL-6 oder IL-17. Auch IL-6 kann in synovialen Gewebe von RA-Patienten gefunden werden (Okamoto et al. (1997)). Die Konzentration von IL-6 und seinem löslichen Rezeptor in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten ist erhöht und korreliert mit der Gelenkzerstörung (Kotake et al. (1996)). DBA/1 IL-6^{-/-} Mäuse entwickeln keine, bzw. nur eine verzögerte CIA, deren Verlauf milder ist als in den Wildtyp Tieren (Alonzi et al. (1998), Sasai et al. (1999)). IL-6 ist unter anderem bekannt dafür, dass es die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen induziert (Van Damme et al. (1987)). Eine entscheidende Rolle des IL-6 könnte also darin liegen, dass es unterstützend bei der Generierung von Antikörpern gegen G6PI in der Milz wirkt. Ein Fak-

tor, der diese Hypothese unterstützt ist, dass IL-6 hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen der Milz produziert wird, dem Ort, wo wahrscheinlich die B-Zellreifung zu anti-G6PI Antikörper produzierenden Plasmazellen stattfindet. Auch in RA-Patienten konnte eine direkte Korrelation zwischen der IL-6 Konzentration in der Synovialflüssigkeit und der Konzentration von IgG gezogen werden (Hermann et al. (1989)). IL-6 besitzt stimulatorische Aktivität auf Osteoklasten, so dass ähnlich wie beim TNF- α auch IL-6 die Knochenbildung inhibieren und -resorption fördern könnte (Roodman (1992)). Für diesen Punkt spricht auch, dass in IL-6 defizienten Mäusen eine Antigen induzierte Arthritis sehr mild verläuft, ohne dass es zu einer Zerstörung des Knochens kommt (Ohshima et al. (1998)). In DBA/1 IL-6^{-/-} Mäusen wird die T-Zellantwort in Richtung einer Th2 Antwort verschoben (Sasai et al. (1999)), so dass eine Funktion des IL-6 auch sein könnte, dass eine Immunreaktion gegen G6PI eher in Th1 Richtung läuft und somit die Entzündung vermittelt. IL-6 spielt auch eine Rolle bei der durch IL-1 induzierten Produktion von einigen Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren. IL-6 kann in das Gleichgewicht zwischen degradierenden Enzymen und ihren Inhibitoren eingreifen und dieses Gleichgewicht empfindlich in Richtung Degradation stören kann (Ito et al. (1992)). Alle diese beschriebenen Funktionen könnten auch in der G6PI-induzierten Arthritis zu der massiven Zerstörung des Knorpels und der Knochen beitragen.

In der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten kann IL-17 gemessen werden und T-Zellklone, die aus RA-Patienten gewonnen und expandiert wurden, exprimieren IL-17 (Aarvak et al. (1999), Ziolkowska et al. (2000)). In der CIA konnte gezeigt werden, dass IL-17^{-/-} Mäuse eine Arthritis mit geringer Inzidenz entwickeln (Nakae et al. (2003)). IL-17 induziert allein oder zusammen mit IL-1 die Expression von Metalloproteinasen in Synoviozyten. Dieser Effekt kann durch einen blockierenden anti-IL-17 Antikörper aufgehoben werden (Chabaud et al. (2000)). IL-1, IL-17 und TNF- α haben einen synergistischen Effekt auf die Expression von MIP3 α , einem Chemokin, welches einen Einfluss auf die Migration von T-Gedächtniszellen und immaturen dendritischen Zellen von RA-Patienten hat (Chabaud et al. (2001)). Zusammengefasst wird deutlich, dass die in der G6PI-induzierten Arthritis von CD4⁺ T-Zellen exprimierten Zytokine jedes für sich massive pro-inflammatorische Eigenschaften besitzt, die durch synergistische Effekte noch verstärkt werden können. Die Tatsache, dass die Depletion der CD4⁺ T-Zellen in der Effektorphase zu einer schnellen Abnahme der Arthritis führt, zeigt, dass die CD4⁺ T-Zellen und somit möglicherweise auch ihre produzierten Zytokine massiv an der Entwicklung beteiligt sind. In Zukunft muss auch mit Hilfe von IL-6 und IL-17 defizienten Mäusen oder aber mit Hilfe von Antikörpern bzw. löslicher Rezeptoren gegen IL-6 und IL-17 gezeigt werden, welche Rolle sie in der G6PI-induzierten Arthritis spielen. Daneben

gibt es auch noch andere Zytokine, die für die Entwicklung der Arthritis von Bedeutung sein könnten. Hierzu zählt insbesondere IL-1, wo schon deutlich gezeigt werden konnte, dass es in RA und auch in unterschiedlichen Tiermodellen wichtig ist.

5.2.6 Die Rolle von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis

Die CD4⁺ T-Zellen der nicht-suszeptiblen Stämme lassen sich nicht mit G6PI restimulieren. In den DBA/1 Mäusen nimmt die Arthritis zwei Tage nach der maximalen CD4⁺ T-Zellantwort in den inguinalen Lymphknoten wieder ab. An diesen Beobachtungen könnten möglicherweise regulatorische CD4⁺CD25⁺ Zellen beteiligt sein. Diese Zellen könnten in den nicht-suszeptiblen Stämmen verhindern, dass potentiell autoreaktive G6PI-spezifische CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden und proliferieren. Außerdem könnten diese Zellen auch dafür verantwortlich sein, dass nach der Induktion der G6PI-induzierten Arthritis in den DBA/1 Mäusen die CD4⁺ T-Zellantwort bzw. die gesamte Immunantwort gegen G6PI herunter reguliert wird. Bei den regulatorischen T-Zellen handelt es sich um eine Population von ca. 10% der CD4⁺ T-Zellen, den CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Sakaguchi et al. (1995)). Diese Zellen sind anerg und unterbinden die Proliferation anderer nicht-regulatorischer T-Zellen. Im Laufe der Jahre konnte gezeigt werden, dass diese Population von T-Zellen das Potential hat, Autoimmunkrankheiten wie zum Beispiel Diabetes, Arthritis und entzündliche Darmerkrankungen in Tierversuchen zu verhindern bzw. durch deren Fehlen, die Erkrankungen zu verschlimmern (Homann und von Herrath (2004), Martin et al. (2004), Morgan et al. (2003)). In der G6PI-induzierten Arthritis sollte daher untersucht werden, ob CD4⁺CD25⁺ T-Zellen den Verlauf der Arthritis in DBA/1 Mäusen beeinflussen können bzw. in den nicht-suszeptiblen Stämmen eine Arthritis verhindern. Dazu wurden in DBA/1 Mäusen und in nicht-suszeptiblen BALB/c Mäusen die CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen durch einen depletierenden Antikörper entfernt und die Tiere anschließend mit G6PI immunisiert. Die DBA/1 Mäuse entwickelten eine Arthritis mit chronischem Verlauf, während die BALB/c Mäuse klinisch kaum Zeichen einer Arthritis zeigten (Kap. 4.4.8). Histologisch konnte in den BALB/c Mäusen jedoch in einigen Tieren eine leichte Synovitis festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen ganz deutlich, dass regulatorische T-Zellen einen wichtigen Einfluss auf den Verlauf der G6PI-induzierten Arthritis in DBA/1 Mäusen haben. Diese Zellen scheinen die CD4⁺ T-Zellantwort nach einer primären Antwort gegen G6PI zu regulieren. Dies könnte eine Erklärung sein, warum die Arthritis nach 15 Tagen langsam wieder abnimmt. Somit stimmen die Ergebnisse gut mit dem vorher beschriebenen Depletionsexperiment überein. In einem Fall werden die CD4⁺ T-Zellen ganz entfernt und können dadurch die Arthritis nicht aufrechterhalten, im anderen Fall wird ihre Funktion durch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen supprimiert. In der Zukunft muss durch Transferexpe-

rimente gezeigt werden, ob die $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen erst durch die Immunreaktion gegen G6PI gebildet werden oder schon vorher vorhanden waren. Dies könnte ein bedeutender Unterschied zwischen dem DBA/1 Stamm und den anderen nicht-suszeptiblen Stämmen sein. Die Entwicklung einer leichten Synovitis in den BALB/c Tieren macht deutlich, dass auch in diesem Stamm die Toleranz gegenüber G6PI durch die Depletion der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen teilweise überwunden werden konnte. Somit scheint es in der Peripherie tatsächlich autoreaktive G6PI-spezifische $CD4^+$ T-Zellen zu geben, die nach Entfernung der regulatorischen Zellen in der Lage sind, eine schwache Entzündung in den Gelenken hervorzurufen. Gleichzeitig wird aber auch deutlich, dass die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen allein nicht verantwortlich sind für das Ausbleiben einer Arthritis in den nicht-suszeptiblen Stämmen, da die beobachtete Entzündung nur minimal ist.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

G6PI ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht das wesentliche Autoantigen ist, welches für die Pathogenese der RA verantwortlich ist und spielt möglicherweise nur in einer Subpopulation von RA-Patienten eine Rolle. Die G6PI-induzierte Arthritis, die in dieser Arbeit etabliert wurde, reflektiert histopathologisch sehr gut die rheumatoide Arthritis und eignet sich deshalb und auch wegen der leichten Induzierbarkeit sehr gut als ein Tiermodell für RA. Dieses Modell kann sehr gut verwendet werden, um mögliche therapeutisch relevante Zielmoleküle zu testen. Mit Hilfe des löslichen Rezeptors für $TNF-\alpha$ (Enbrel®) konnte das für $TNF-\alpha$ schon gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die G6PI-induzierte Arthritis durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen reguliert wird. In diesem Modell findet man eine Verknüpfung der adaptiven, humoralen und angeborenen Immunität und es scheint, dass eine Arthritis nur dann induziert werden kann, wenn alle Komponenten in einem streng reguliertem Rahmen zusammenwirken. Das modulieren einzelner Komponenten, sei es durch die Depletion der $CD4^+$ -Zellen, das Entfernen des Komplementfaktors C5, der Blockierung von $TNF-\alpha$, der Verwendung $Fc\gamma$ -R defizienter Mäuse oder der Depletion regulatorischer T-Zellen führt sofort zu einem veränderten Verlauf der Arthritis. In der Zukunft muss vor allem die Rolle der anti-G6PI Antikörper genauer untersucht werden. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen G6PI kann dann deren Spezifität, ihre Epitope und Affinität mit Antikörpern anderer Stämme verglichen werden. Zusätzlich muss besonderen Wert auf die Rolle der T-Zellen gelegt werden, da sie das zentrale Element in der G6PI-induzierten Arthritis sind. Hier sollte vor allem untersucht werden, welche Eigenschaften die T-Zellen haben, die in das Gelenk migrieren, z.B. in Form der Zytokine, die sie dort exprimieren und mit welche Zellen sie

interagieren. Weiterhin muss auch die Generierung autoreaktiver G6PI-spezifischer T-Zellen im Thymus und ihre Kontrolle in der Peripherie analysiert werden. Zusätzlich sollte auch die Rolle der Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen untersucht werden. Insgesamt wurde mit der G6PI induzierten Arthritis zum ersten Mal gezeigt, dass die Immunisierung mit einem systemischen Antigen eine organspezifische Erkrankung in Form einer Arthritis induzieren kann. Damit wurde ein Modell etabliert, welches die Lücke zwischen dem K/BxN-Modell und der komplexen humanen Situation schließt und die Untersuchung pathologisch relevanter Mechanismen und therapeutischer Strategien ermöglicht.

Zusammenfassung

In der Maus wurde die arthritogene Rolle der Glukose-6-phosphat Isomerase (G6PI) untersucht. Nach Immunisierung unterschiedlicher Mausstämme mit humaner G6PI entwickelten 95% der genetisch suszeptiblen DBA/1 Mäuse eine symmetrische Polyarthrititis. Die Arthritis bei den DBA/1 Mäusen manifestierte sich 9 Tage nach Immunisierung, erreichte klinisch am Tag 14 ihr Maximum und nahm anschließend wieder langsam ab. Histologisch konnte vor allem ein Befall der distalen Gelenke nachgewiesen werden. Die Arthritis war charakterisiert durch eine massive Synovitis mit Pannusformierung, Tenosynovitis, Periarthritis, Periostitis und führte zu einer Zerstörung des Knorpels und Knochen.

Die DBA/1 Mäuse produzierten beginnend von Tag 6 an hohe Antikörpertiter gegen humane und murine G6PI. Die Arthritis konnte jedoch nicht durch Injektion von aufgereinigten Antikörpern aus dem Serum arthritischer Mäuse in Empfängermause transferiert werden. Jedoch wurde über die Verwendung von Fc γ -Rezeptor defizienten Mäusen auf dem DBA/1 Hintergrund die bedeutende Rolle der Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis nachgewiesen. DBA/1 Mäuse, die defizient für die gemeinsame γ -Kette der Fc γ -Rezeptoren waren, entwickelten eine Arthritis mit geringer Inzidenz und mildem klinischen Verlauf. Bei den Fc γ RIIB^{-/-} DBA/1 Mäusen entwickelten alle Tiere eine Arthritis, die klinisch und histologisch stärker ausgeprägt war, als in den Wildtyp DBA/1 Mäusen.

Die CD4⁺ T-Zellen in den DBA/1 Mäusen produzierten nach Restimulation mit G6PI hauptsächlich TNF- α , IL-17 und IL-6. Nach Blockade des TNF- α durch einen löslichen dimeren TNF-Rezeptor (Etanercept) war die Inzidenz der Arthritis erniedrigt und entwickelte sich verzögert. Die CD4⁺ T-Zellen spielten sowohl in der Induktionsphase als auch in der Effektorphase eine bedeutende Rolle. Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen zu einem Zeitpunkt vor der Entwicklung oder im Verlauf der Arthritis verhinderte die Entwicklung der Arthritis in den meisten Mäusen bzw. führte zur schnellen Heilung in den behandelten Tieren. Die Depletion einer Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen, die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, führte zu einem chronischen Verlauf der Arthritis.

Neben der Beteiligung der humoralen und adaptiven Immunantwort konnte auch die Beteiligung des Komplements gezeigt werden. DBA/1 Mäuse entwickelten nach Depletion des zentralen Proteins der Komplementkaskade C5 eine Arthritis geringerer Inzidenz und mildem Verlauf.

Mit der G6PI induzierten Arthritis konnte ein neues Mausmodell etabliert werden, das viele Gemeinsamkeiten mit der humanen RA aufweist. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden,

dass die Immunisierung mit einem systemischen Antigen eine organspezifische Erkrankung in Form einer Arthritis induziert.

Zusätzlich wurde die Relevanz der G6PI bei der Pathogenese der humanen RA untersucht. Im Blut von RA-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Spendern keine erhöhte Frequenz autoreaktiver TNF- α oder IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen nach Restimulation mit rekombinanter humaner G6PI im Durchflusszytometer ermittelt werden. Auch erhöhte Antikörpertiter gegen humane G6PI im Serum von RA-Patienten oder Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen konnten im ELISA nicht gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass G6PI nicht das wesentliche Autoantigen ist, welches bei der Pathogenese der humanen RA beteiligt ist. Jedoch könnte die Überlegung, dass eine Immunantwort gegen ein systemisches Antigen eine organspezifische Erkrankung auslösen kann, für zukünftige pathogenetische Untersuchungen von Bedeutung sein.

Abkürzungsverzeichnis

AMF	engl.: autocrine motility factor
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	engl.: cluster of differentiation
CFA	komplettes Freundesches Adjuvans
CFDA-SE	5-(6) Carboxyfluorescein Diacetat, succinimidyl Ester
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CII	Kollagen II
CK-M	Kreatinkinase M-Kette
Cy5	Indodicarbocyanin
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleotid
dsDNS	doppelsträngige DNS
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Flourescein Isothiocyanat
G6PI	Glukose-6-phosphat Isomerase
GK	Glukokortikoide
HE	Hämatoxylin und Eosin
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KM	Kulturmedium
LPS	Lipopolysaccharid
LWA	Langfristig wirkende Antirheumatika
	engl.: matrix assisted laser desorption ionization mass
MALDI-MS	spectometry
MCP-	Metacarpophalangeal-
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NSA	Nicht-steroidale Antirheumatika
ml	Milliliter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OspA	engl.: outer surface protein A
Ova	Ovalbumin
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PIP-	Proximal Interphalangeal-
PTP-	Proximal Metatarsophalangeal-
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetat
PMF	engl.: peptide mass fingerprint
POD	Peroxidase
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
rhG6PI	rekombinante humane G6PI
rmG6PI	rekombinante murine G6PI
s.c.	subkutan

SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SEM	Standardfehler (engl.: Standard Srror of the Mean)
SLE	systemischer Lupus Erythematodis
sTNFR-p75	Etanercept (löslicher dimerer TNF-Rezeptor)
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
U	engl.: unit
WM	Waschmedium
ZNS	zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

- Aarvak, T.; Chabaud, M.; Miossec, P. und Natvig, J. B. (1999): IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells, *J Immunol* 162 [3], Seite 1246-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9973376
- Ali, M.; Ponchel, F.; Wilson, K. E.; Francis, M. J.; Wu, X.; Verhoef, A.; Boylston, A. W.; Veale, D. J.; Emery, P.; Markham, A. F.; Lamb, J. R. und Isaacs, J. D. (2001): Rheumatoid arthritis synovial T cells regulate transcription of several genes associated with antigen-induced anergy, *J Clin Invest* 107 [4], Seite 519-28. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11181651
- Alonzi, T.; Fattori, E.; Lazzaro, D.; Costa, P.; Probert, L.; Kollias, G.; De Benedetti, F.; Poli, V. und Ciliberto, G. (1998): Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis, *J Exp Med* 187 [4], Seite 461-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9463396
- Amigorena, S.; Lankar, D.; Briken, V.; Gapin, L.; Viguiier, M. und Bonnerot, C. (1998): Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens, *J Exp Med* 187 [4], Seite 505-15. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9463401
- Andersson, E. C.; Hansen, B. E.; Jacobsen, H.; Madsen, L. S.; Andersen, C. B.; Engberg, J.; Rothbard, J. B.; McDevitt, G. S.; Malmstrom, V.; Holmdahl, R.; Svejgaard, A. und Fugger, L. (1998): Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [13], Seite 7574-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9636191
- Andersson, M. und Holmdahl, R. (1990): Analysis of type II collagen-reactive T cells in the mouse. I. Different regulation of autoreactive vs. non-autoreactive anti-type II collagen T cells in the DBA/1 mouse, *Eur J Immunol* 20 [5], Seite 1061-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1694131
- Bathon, J. M.; Martin, R. W.; Fleischmann, R. M.; Tesser, J. R.; Schiff, M. H.; Keystone, E. C.; Genovese, M. C.; Wasko, M. C.; Moreland, L. W.; Weaver, A. L.; Markenson, J. und Finck, B. K. (2000): A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis, *N Engl J Med* 343 [22], Seite 1586-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11096165

- Behlke, M. A.; Chou, H. S.; Huppi, K. und Loh, D. Y. (1986): Murine T-cell receptor mutants with deletions of beta-chain variable region genes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [3], Seite 767-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3456168
- Beutler, B. und Cerami, A. (1989): The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response, *Annu Rev Immunol* 7, Seite 625-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2540776
- Boissier, M. C.; Feng, X. Z.; Carlouz, A.; Roudier, R. und Fournier, C. (1987): Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis, *Ann Rheum Dis* 46 [9], Seite 691-700. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3675011
- Brahn, E. und Trentham, D. E. (1984): Effect of antithymocyte serum on collagen arthritis in rats: evidence that T cells are involved in its pathogenesis, *Cell Immunol* 86 [2], Seite 421-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6610483
- Brennan, F. M.; Chantry, D.; Jackson, A.; Maini, R. und Feldmann, M. (1989): Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis, *Lancet* 2 [8657], Seite 244-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2569055
- Bresnihan, B.; Alvaro-Gracia, J. M.; Cobby, M.; Doherty, M.; Domljan, Z.; Emery, P.; Nuki, G.; Pavelka, K.; Rau, R.; Rozman, B.; Watt, I.; Williams, B.; Aitchison, R.; McCabe, D. und Musikic, P. (1998): Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, *Arthritis Rheum* 41 [12], Seite 2196-204. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9870876
- Brodeur, J. P.; Ruddy, S.; Schwartz, L. B. und Moxley, G. (1991): Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 34 [12], Seite 1531-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1747138
- Carlsen, S.; Hansson, A. S.; Olsson, H.; Heinegard, D. und Holmdahl, R. (1998): Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats, *Clin Exp Immunol* 114 [3], Seite 477-84. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9844060
- Cathcart, E. S.; Hayes, K. C.; Gonnerman, W. A.; Lazzari, A. A. und Franzblau, C. (1986): Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen,

- Lab Invest 54 [1], Seite 26-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3941539
- Cha, H. S.; Kim, T. J.; Kim, J. Y.; Lee, M. H.; Jeon, C. H.; Kim, J.; Bae, E. K.; Ahn, K. S. und Koh, E. M. (2004): Autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients, *Scand J Rheumatol* 33 [3], Seite 179-84. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15228189
- Chabaud, M.; Garnero, P.; Dayer, J. M.; Guerne, P. A.; Fossiez, F. und Miossec, P. (2000): Contribution of interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis, *Cytokine* 12 [7], Seite 1092-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10880256
- Chabaud, M.; Page, G. und Miossec, P. (2001): Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines, *J Immunol* 167 [10], Seite 6015-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11698482
- Chang, Y. H.; Pearson, C. M. und Abe, C. (1980): Adjuvant polyarthritis. IV. Induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic, and other studies, *Arthritis Rheum* 23 [1], Seite 62-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7352945
- Chang, Y. H.; Pearson, C. M. und Chedid, L. (1981): Adjuvant polyarthritis. V. Induction by N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, the smallest peptide subunit of bacterial peptidoglycan, *J Exp Med* 153 [4], Seite 1021-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6972989
- Chaput, M.; Claes, V.; Portetelle, D.; Cludts, I.; Cravador, A.; Burny, A.; Gras, H. und Tartar, A. (1988): The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase, *Nature* 332 [6163], Seite 454-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3352744
- Cobbold, S. P.; Martin, G. und Waldmann, H. (1990): The induction of skin graft tolerance in major histocompatibility complex-mismatched or primed recipients: primed T cells can be tolerized in the periphery with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies, *Eur J Immunol* 20 [12], Seite 2747-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1980112

- Cohen, S.; Hurd, E.; Cush, J.; Schiff, M.; Weinblatt, M. E.; Moreland, L. W.; Kremer, J.; Bear, M. B.; Rich, W. J. und McCabe, D. (2002): Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum* 46 [3], Seite 614-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11920396
- Corr, M. und Crain, B. (2002): The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis, *J Immunol* 169 [11], Seite 6604-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12444173
- Corthay, A.; Johansson, A.; Vestberg, M. und Holmdahl, R. (1999): Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice, *Int Immunol* 11 [7], Seite 1065-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10383939
- Courtenay, J. S.; Dallman, M. J.; Dayan, A. D.; Martin, A. und Mosedale, B. (1980): Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice, *Nature* 283 [5748], Seite 666-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6153460
- Cremer, M. A.; Ye, X. J.; Terato, K.; Griffiths, M. M.; Watson, W. C. und Kang, A. H. (1998): Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for auto-immune and arthritogenic activities, *Clin Exp Immunol* 112 [3], Seite 375-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9649204
- Despres, N.; Talbot, G.; Plouffe, B.; Boire, G. und Menard, H. A. (1995): Detection and expression of a cDNA clone that encodes a polypeptide containing two inhibitory domains of human calpastatin and its recognition by rheumatoid arthritis sera, *J Clin Invest* 95 [4], Seite 1891-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7706496
- Dolhain, R. J.; van der Heiden, A. N.; ter Haar, N. T.; Breedveld, F. C. und Miltenburg, A. M. (1996): Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 39 [12], Seite 1961-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8961900
- Dorner, T.; Egerer, K.; Feist, E. und Burmester, G. R. (2004): Rheumatoid factor revisited, *Curr Opin Rheumatol* 16 [3], Seite 246-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15103252

- Duncan, A. R. und Winter, G. (1988): The binding site for C1q on IgG, *Nature* 332 [6166], Seite 738-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3258649
- Edwards, J. C. (1994): The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation, *J Anat* 184 (Pt 3), Seite 493-501. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7928638
- Edwards, J. C.; Szczepanski, L.; Szechinski, J.; Filipowicz-Sosnowska, A.; Emery, P.; Close, D. R.; Stevens, R. M. und Shaw, T. (2004): Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis, *N Engl J Med* 350 [25], Seite 2572-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15201414
- Elliott, M. J.; Maini, R. N.; Feldmann, M.; Kalden, J. R.; Antoni, C.; Smolen, J. S.; Leeb, B.; Breedveld, F. C.; Macfarlane, J. D.; Bijl, H. und et al. (1994): Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis, *Lancet* 344 [8930], Seite 1105-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7934491
- Englert, M. E.; Ferguson, K. M.; Suarez, C. R.; Oronsky, A. L. und Kerwar, S. S. (1986): Passive transfer of collagen arthritis: heterogeneity of anti-collagen IgG, *Cell Immunol* 101 [2], Seite 373-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2428515
- Erickson, R. P.; Tachibana, D. K.; Herzenberg, L. A. und Rosenberg, L. T. (1964): A Single Gene Controlling Hemolytic Complement and a Serum Antigen in the Mouse, *J Immunol* 92, Seite 611-5. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14139033
- Faik, P.; Walker, J. I.; Redmill, A. A. und Morgan, M. J. (1988): Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences, *Nature* 332 [6163], Seite 455-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3352745
- Fava, R.; Olsen, N.; Keski-Oja, J.; Moses, H. und Pincus, T. (1989): Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions, *J Exp Med* 169 [1], Seite 291-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2909658

- Feldmann, M.; Brennan, F. M. und Maini, R. N. (1996): Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu Rev Immunol* 14, Seite 397-440. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8717520
- Firestein, G. S. (2003): Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature* 423 [6937], Seite 356-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12748655
- Firestein, G. S.; Alvaro-Gracia, J. M. und Maki, R. (1990): Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis, *J Immunol* 144 [9], Seite 3347-53. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2109776
- Firestein, G. S. und Zvaifler, N. J. (1990): How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?, *Arthritis Rheum* 33 [6], Seite 768-73. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2194461
- Frei, Y.; Lambris, J. D. und Stockinger, B. (1987): Generation of a monoclonal antibody to mouse C5 application in an ELISA assay for detection of anti-C5 antibodies, *Mol Cell Probes* 1 [2], Seite 141-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3453897
- Fugger, L.; Rothbard, J. B. und Sonderstrup-McDevitt, G. (1996): Specificity of an HLA-DRB1*0401-restricted T cell response to type II collagen, *Eur J Immunol* 26 [4], Seite 928-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8625990
- Gabriel, S. E. (2001): The epidemiology of rheumatoid arthritis, *Rheum Dis Clin North Am* 27 [2], Seite 269-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11396092
- Glant, T. T.; Cs-Szabo, G.; Nagase, H.; Jacobs, J. J. und Mikecz, K. (1998): Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from normal and osteoarthritic human cartilage, *Arthritis Rheum* 41 [6], Seite 1007-18. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9627010
- Graham Solomons, J. T.; Zimmerly, E. M.; Burns, S.; Krishnamurthy, N.; Swan, M. K.; Krings, S.; Muirhead, H.; Chirgwin, J. und Davies, C. (2004): The crystal structure of mouse phosphoglucose isomerase at 1.6Å resolution and its complex with glucose 6-phosphate reveals the catalytic mechanism of sugar ring opening, *J Mol Biol* 342 [3], Seite 847-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15342241

- Gregersen, P. K.; Silver, J. und Winchester, R. J. (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 30 [11], Seite 1205-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2446635
- Gurney, M. E.; Apatoff, B. R.; Spear, G. T.; Baumel, M. J.; Antel, J. P.; Bania, M. B. und Reder, A. T. (1986a): Neuroleukin: a lymphokine product of lectin-stimulated T cells, *Science* 234 [4776], Seite 574-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3020690
- Gurney, M. E.; Heinrich, S. P.; Lee, M. R. und Yin, H. S. (1986b): Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons, *Science* 234 [4776], Seite 566-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3764429
- Hamano, Y.; Arase, H.; Saisho, H. und Saito, T. (2000): Immune complex and Fc receptor-mediated augmentation of antigen presentation for in vivo Th cell responses, *J Immunol* 164 [12], Seite 6113-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10843660
- Hassfeld, W.; Steiner, G.; Hartmuth, K.; Kolarz, G.; Scherak, O.; Graninger, W.; Thumb, N. und Smolen, J. S. (1989): Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 32 [12], Seite 1515-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2597207
- Hermann, E.; Fleischer, B.; Mayet, W. J.; Poralla, T. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1989): Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis, *Clin Exp Rheumatol* 7 [4], Seite 411-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2591114
- Herve, C. A.; Wait, R. und Venables, P. J. (2003): Glucose-6-phosphate isomerase is not a specific autoantigen in rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)* 42 [8], Seite 986-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12730513
- Hietala, M. A.; Jonsson, I. M.; Tarkowski, A.; Kleinau, S. und Pekna, M. (2002): Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice, *J Immunol* 169 [1], Seite 454-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12077276

- Holmdahl, R.; Bockermann, R.; Backlund, J. und Yamada, H. (2002): The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis, *Ageing Res Rev* 1 [1], Seite 135-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12039453
- Holmdahl, R.; Jansson, L.; Andersson, M. und Larsson, E. (1988): Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis, *Immunology* 65 [2], Seite 305-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3192274
- Holmdahl, R.; Jansson, L.; Gullberg, D.; Rubin, K.; Forsberg, P. O. und Klareskog, L. (1985a): Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II, *Clin Exp Immunol* 62 [3], Seite 639-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4085150
- Holmdahl, R.; Jansson, L.; Larsson, A. und Jonsson, R. (1990): Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies, *Scand J Immunol* 31 [2], Seite 147-57. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1968678
- Holmdahl, R.; Jansson, L.; Larsson, E.; Rubin, K. und Klareskog, L. (1986): Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice, *Arthritis Rheum* 29 [1], Seite 106-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3947407
- Holmdahl, R.; Klareskog, L.; Rubin, K.; Larsson, E. und Wigzell, H. (1985b): T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones, *Scand J Immunol* 22 [3], Seite 295-306. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2413528
- Hom, J. T.; Butler, L. D.; Riedl, P. E. und Bendele, A. M. (1988): The progression of the inflammation in established collagen-induced arthritis can be altered by treatments with immunological or pharmacological agents which inhibit T cell activities, *Eur J Immunol* 18 [6], Seite 881-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3260183
- Homann, D. und von Herrath, M. (2004): Regulatory T cells and type 1 diabetes, *Clin Immunol* 112 [3], Seite 202-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15308110

- Ishikawa, H.; Smiley, J. D. und Ziff, M. (1975): Electron microscopic demonstration of immunoglobulin deposition in rheumatoid cartilage, *Arthritis Rheum* 18 [6], Seite 563-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=54168
- Ito, A.; Itoh, Y.; Sasaguri, Y.; Morimatsu, M. und Mori, Y. (1992): Effects of interleukin-6 on the metabolism of connective tissue components in rheumatoid synovial fibroblasts, *Arthritis Rheum* 35 [10], Seite 1197-201. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1418006
- Ji, H.; Gauguier, D.; Ohmura, K.; Gonzalez, A.; Duchatelle, V.; Danoy, P.; Garchon, H. J.; Degott, C.; Lathrop, M.; Benoist, C. und Mathis, D. (2001): Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis, *J Exp Med* 194 [3], Seite 321-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11489951
- D. M.; Hofhuis, F. M.; Boackle, S. A.; Takahashi, K.; Holers, V. M.; Walport, M.; Gerard, C.; Ezekowitz, A.; Carroll, M. C.; Brenner, M.; Weissleder, R.; Verbeek, J. S.; Duchatelle, V.; Degott, C.; Benoist, C. und Mathis, D. (2002a): Arthritis critically dependent on innate immune system players, *Immunity* 16 [2], Seite 157-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11869678
- Ji, H.; Pettit, A.; Ohmura, K.; Ortiz-Lopez, A.; Duchatelle, V.; Degott, C.; Gravalles, E.; Mathis, D. und Benoist, C. (2002b): Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis, *J Exp Med* 196 [1], Seite 77-85. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12093872
- Jose, P. J.; Moss, I. K.; Maini, R. N. und Williams, T. J. (1990): Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase, *Ann Rheum Dis* 49 [10], Seite 747-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2241262
- Jouen, F.; Vittecoq, O.; Leguillou, F.; Tabti-Titon, I.; Menard, J. F.; Mejjad, O.; Pouplin, S.; Boumier, P.; Fardellone, P.; Gayet, A.; Gilbert, D.; Tron, F. und Le Loet, X. (2004): Diagnostic and prognostic values of anti glucose-6-phosphate isomerase antibodies in community-recruited patients with very early arthritis, *Clin Exp Immunol* 137 [3], Seite 606-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15320914
- Kassahn, D.; Kolb, C.; Solomon, S.; Bochtler, P. und Illges, H. (2002): Few human autoimmune sera detect GPI, *Nat Immunol* 3 [5], Seite 411-2; author reply 412-3. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11976712

- Katsikis, P. D.; Chu, C. Q.; Brennan, F. M.; Maini, R. N. und Feldmann, M. (1994): Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis, *J Exp Med* 179 [5], Seite 1517-27. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8163935
- Keffer, J.; Probert, L.; Cazlaris, H.; Georgopoulos, S.; Kaslaris, E.; Kioussis, D. und Kollias, G. (1991): Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis, *Embo J* 10 [13], Seite 4025-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1721867
- Kjellen, P.; Brunsberg, U.; Broddefalk, J.; Hansen, B.; Vestberg, M.; Ivarsson, I.; Engstrom, A.; Svejgaard, A.; Kihlberg, J.; Fugger, L. und Holmdahl, R. (1998): The structural basis of MHC control of collagen-induced arthritis; binding of the immunodominant type II collagen 256-270 glycopeptide to H-2Aq and H-2Ap molecules, *Eur J Immunol* 28 [2], Seite 755-67. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9521085
- Klaus, G. G.; Pepys, M. B.; Kitajima, K. und Askonas, B. A. (1979): Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody, *Immunology* 38 [4], Seite 687-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=521057
- Kleinau, S.; Martinsson, P. und Heyman, B. (2000): Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct fcgamma receptors, *J Exp Med* 191 [9], Seite 1611-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10790435
- Klippel, J. H. und Dieppe, P. A. (1998): *Rheumatology*, 2nd. Auflage, Mosby International, London.
- Koch, A. E.; Burrows, J. C.; Haines, G. K.; Carlos, T. M.; Harlan, J. M. und Leibovich, S. J. (1991): Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues, *Lab Invest* 64 [3], Seite 313-20. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1706003
- Kohashi, O.; Aihara, K.; Ozawa, A.; Kotani, S. und Azuma, I. (1982): New model of a synthetic adjuvant, N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine- induced arthritis: clinical and histologic studies in athymic nude and euthymic rats, *Lab Invest* 47 [1], Seite 27-36. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7087395

- Korganow, A. S.; Ji, H.; Mangialaio, S.; Duchatelle, V.; Pelanda, R.; Martin, T.; Degott, C.; Kikutani, H.; Rajewsky, K.; Pasquali, J. L.; Benoist, C. und Mathis, D. (1999): From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins, *Immunity* 10 [4], Seite 451-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229188
- Kotake, S.; Sato, K.; Kim, K. J.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Nakamura, I.; Yamaguchi, A.; Kishimoto, T.; Suda, T. und Kashiwazaki, S. (1996): Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation, *J Bone Miner Res* 11 [1], Seite 88-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8770701
- Kouskoff, V.; Korganow, A. S.; Duchatelle, V.; Degott, C.; Benoist, C. und Mathis, D. (1996): Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity, *Cell* 87 [5], Seite 811-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8945509
- Kremer, J. M.; Westhovens, R.; Leon, M.; Di Giorgio, E.; Alten, R.; Steinfeld, S.; Russell, A.; Dougados, M.; Emery, P.; Nuamah, I. F.; Williams, G. R.; Becker, J. C.; Hagerty, D. T. und Moreland, L. W. (2003): Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig, *N Engl J Med* 349 [20], Seite 1907-15. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14614165
- Krenn, V.; Morawietz, L.; Haupl, T.; Neidel, J.; Petersen, I. und Konig, A. (2002): Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology, *Pathol Res Pract* 198 [5], Seite 317-25. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12092767
- Kyburz, D.; Carson, D. A. und Corr, M. (2000): The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN mouse model of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 43 [11], Seite 2571-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11083282
- Lee, D. M.; Friend, D. S.; Gurish, M. F.; Benoist, C.; Mathis, D. und Brenner, M. B. (2002): Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis, *Science* 297 [5587], Seite 1689-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12215644
- Lee, Y. H.; Choi, S. J.; Ji, J. D. und Song, G. G. (2000): Serum creatine kinase in patients with rheumatic diseases, *Clin Rheumatol* 19 [4], Seite 296-300. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10941812

- Lipsky, P. E.; van der Heijde, D. M.; St Clair, E. W.; Furst, D. E.; Breedveld, F. C.; Kalden, J. R.; Smolen, J. S.; Weisman, M.; Emery, P.; Feldmann, M.; Harriman, G. R. und Maini, R. N. (2000): Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group, *N Engl J Med* 343 [22], Seite 1594-602. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11096166
- Maccioni, M.; Zeder-Lutz, G.; Huang, H.; Ebel, C.; Gerber, P.; Hergueux, J.; Marchal, P.; Duchatelle, V.; Degott, C.; van Regenmortel, M.; Benoist, C. und Mathis, D. (2002): Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice, *J Exp Med* 195 [8], Seite 1071-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11956298
- Maddison, P. J.; Isenberg, D.; Woo, P.; Glass, D. N. und Breedveld, F. C. (2004): Oxford Textbook of Rheumatology, 3rd ed. Auflage, Oxford University Press, ISBN: 0-19-850948-0.
- Maini, R. N.; Breedveld, F. C.; Kalden, J. R.; Smolen, J. S.; Davis, D.; Macfarlane, J. D.; Antoni, C.; Leeb, B.; Elliott, M. J.; Woody, J. N.; Schaible, T. F. und Feldmann, M. (1998): Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 41 [9], Seite 1552-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9751087
- Malmstrom, V.; Backlund, J.; Jansson, L.; Kihlberg, J. und Holmdahl, R. (2000): T cells that are naturally tolerant to cartilage-derived type II collagen are involved in the development of collagen-induced arthritis, *Arthritis Res* 2 [4], Seite 315-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11056672
- Malmstrom, V.; Michaelsson, E.; Burkhardt, H.; Mattsson, R.; Vuorio, E. und Holmdahl, R. (1996): Systemic versus cartilage-specific expression of a type II collagen-specific T-cell epitope determines the level of tolerance and susceptibility to arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [9], Seite 4480-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8633094
- Mangialaio, S.; Ji, H.; Korganow, A. S.; Kouskoff, V.; Benoist, C. und Mathis, D. (1999): The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis, *Arthritis Rheum* 42 [12], Seite 2517-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10615996
- Martin, B.; Banz, A.; Bienvenu, B.; Cordier, C.; Dautigny, N.; Becourt, C. und Lucas, B. (2004): Suppression of CD4+ T lymphocyte effector functions by CD4+CD25+ cells in vivo, *J Immunol* 172 [6], Seite 3391-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15004137

- Matsumoto, I.; Lee, D. M.; Goldbach-Mansky, R.; Sumida, T.; Hitchon, C. A.; Schur, P. H.; Anderson, R. J.; Coblyn, J. S.; Weinblatt, M. E.; Brenner, M.; Duclos, B.; Pasquali, J. L.; El-Gabalawy, H.; Mathis, D. und Benoist, C. (2003): Low prevalence of antibodies to glucose-6-phosphate isomerase in patients with rheumatoid arthritis and a spectrum of other chronic autoimmune disorders, *Arthritis Rheum* 48 [4], Seite 944-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12687536
- Matsumoto, I.; Maccioni, M.; Lee, D. M.; Maurice, M.; Simmons, B.; Brenner, M.; Mathis, D. und Benoist, C. (2002): How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease, *Nat Immunol* 3 [4], Seite 360-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11896391
- Matsumoto, I.; Staub, A.; Benoist, C. und Mathis, D. (1999): Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme, *Science* 286 [5445], Seite 1732-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10576739
- Maurice, M. M.; Nakamura, H.; van der Voort, E. A.; van Vliet, A. I.; Staal, F. J.; Tak, P. P.; Breedveld, F. C. und Verweij, C. L. (1997): Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis, *J Immunol* 158 [3], Seite 1458-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9013992
- Michaelsson, E.; Andersson, M.; Engstrom, A. und Holmdahl, R. (1992): Identification of an immunodominant type-II collagen peptide recognized by T cells in H-2q mice: self tolerance at the level of determinant selection, *Eur J Immunol* 22 [7], Seite 1819-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1378019
- Moreland, L. W.; Alten, R.; Van den Bosch, F.; Appelboom, T.; Leon, M.; Emery, P.; Cohen, S.; Luggen, M.; Shergy, W.; Nuamah, I. und Becker, J. C. (2002): Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion, *Arthritis Rheum* 46 [6], Seite 1470-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12115176
- Morgan, B. P.; Daniels, R. H. und Williams, B. D. (1988): Measurement of terminal complement complexes in rheumatoid arthritis, *Clin Exp Immunol* 73 [3], Seite 473-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3208454

- Morgan, K.; Clague, R. B.; Shaw, M. J.; Firth, S. A.; Twose, T. M. und Holt, P. J. (1981): Native type II collagen--induced arthritis in the rat: the effect of complement depletion by cobra venom factor, *Arthritis Rheum* 24 [11], Seite 1356-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7317113
- Morgan, M. E.; Suttmuller, R. P.; Witteveen, H. J.; van Duivenvoorde, L. M.; Zanelli, E.; Melief, C. J.; Snijders, A.; Offringa, R.; de Vries, R. R. und Toes, R. E. (2003): CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum* 48 [5], Seite 1452-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12746920
- Morita, Y.; Yamamura, M.; Kawashima, M.; Harada, S.; Tsuji, K.; Shibuya, K.; Maruyama, K. und Makino, H. (1998): Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 41 [9], Seite 1669-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9751101
- Muraki, Y.; Matsumoto, I.; Chino, Y.; Hayashi, T.; Suzuki, E.; Goto, D.; Ito, S.; Murata, H.; Tsutsumi, A. und Sumida, T. (2004): Glucose-6-phosphate isomerase variants play a key role in the generation of anti-GPI antibodies: possible mechanism of autoantibody production, *Biochem Biophys Res Commun* 323 [2], Seite 518-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15369782
- Myers, L. K.; Brand, D. D.; Ye, X. J.; Cremer, M. A.; Rosloniec, E. F.; Bodo, M.; Myllyharju, J.; Helaakoski, T.; Nokelainen, M.; Pihlajaniemi, T.; Kivirikko, K.; Yang, C. L.; Ala-Kokko, L.; Prockop, D. J.; Notbohm, H.; Fietzek, P.; Stuart, J. M. und Kang, A. H. (1998): Characterization of recombinant type II collagen: arthritogenicity and tolerogenicity in DBA/1 mice, *Immunology* 95 [4], Seite 631-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9893056
- Myers, L. K.; Miyahara, H.; Terato, K.; Seyer, J. M.; Stuart, J. M. und Kang, A. H. (1995): Collagen-induced arthritis in B10.RIII mice (H-2r): identification of an arthritogenic T-cell determinant, *Immunology* 84 [4], Seite 509-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7540590
- Nakae, S.; Nambu, A.; Sudo, K. und Iwakura, Y. (2003): Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice, *J Immunol* 171 [11], Seite 6173-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14634133

- Neumann, E.; Barnum, S. R.; Tarner, I. H.; Echols, J.; Fleck, M.; Judex, M.; Kullmann, F.; Mountz, J. D.; Scholmerich, J.; Gay, S. und Muller-Ladner, U. (2002): Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium, *Arthritis Rheum* 46 [4], Seite 934-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11953970
- Nordling, C.; Karlsson-Parra, A.; Jansson, L.; Holmdahl, R. und Klareskog, L. (1992): Characterization of a spontaneously occurring arthritis in male DBA/1 mice, *Arthritis Rheum* 35 [6], Seite 717-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1318050
- Ohshima, S.; Saeki, Y.; Mima, T.; Sasai, M.; Nishioka, K.; Nomura, S.; Kopf, M.; Katada, Y.; Tanaka, T.; Suemura, M. und Kishimoto, T. (1998): Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [14], Seite 8222-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9653168
- Okamoto, H.; Yamamura, M.; Morita, Y.; Harada, S.; Makino, H. und Ota, Z. (1997): The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 40 [6], Seite 1096-105. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9182920
- Olsen, N. J. und Stein, C. M. (2004): New drugs for rheumatoid arthritis, *N Engl J Med* 350 [21], Seite 2167-79. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15152062
- Pearson, C. M. (1956): Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants, *Proc Soc Exp Biol Med* 91 [1], Seite 95-101. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13297719
- Piguet, P. F.; Grau, G. E.; Vesin, C.; Loetscher, H.; Gentz, R. und Lesslauer, W. (1992): Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor, *Immunology* 77 [4], Seite 510-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1337334
- Pincus, T.; Brooks, R. H. und Callahan, L. F. (1994): Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures, *Ann Intern Med* 120 [1], Seite 26-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8250453

- Ranges, G. E.; Sriram, S. und Cooper, S. M. (1985): Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4, *J Exp Med* 162 [3], Seite 1105-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3928802
- Reife, R. A.; Loutis, N.; Watson, W. C.; Hasty, K. A. und Stuart, J. M. (1991): SWR mice are resistant to collagen-induced arthritis but produce potentially arthritogenic antibodies, *Arthritis Rheum* 34 [6], Seite 776-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2053925
- Roodman, G. D. (1992): Interleukin-6: an osteotropic factor?, *J Bone Miner Res* 7 [5], Seite 475-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1615755
- Rosloniec, E. F.; Brand, D. D.; Myers, L. K.; Esaki, Y.; Whittington, K. B.; Zaller, D. M.; Woods, A.; Stuart, J. M. und Kang, A. H. (1998): Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen, *J Immunol* 160 [6], Seite 2573-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9510154
- Rosloniec, E. F.; Brand, D. D.; Myers, L. K.; Whittington, K. B.; Gumanovskaya, M.; Zaller, D. M.; Woods, A.; Altmann, D. M.; Stuart, J. M. und Kang, A. H. (1997): An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen, *J Exp Med* 185 [6], Seite 1113-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9091584
- Rosloniec, E. F.; Whittington, K. B.; Brand, D. D.; Myers, L. K. und Stuart, J. M. (1996): Identification of MHC class II and TCR binding residues in the type II collagen immunodominant determinant mediating collagen-induced arthritis, *Cell Immunol* 172 [1], Seite 21-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8806802
- Sakaguchi, N.; Takahashi, T.; Hata, H.; Nomura, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Sakihama, T.; Matsutani, T.; Negishi, I.; Nakatsuru, S. und Sakaguchi, S. (2003): Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice, *Nature* 426 [6965], Seite 454-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14647385
- Sakaguchi, S.; Sakaguchi, N.; Asano, M.; Itoh, M. und Toda, M. (1995): Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J Immunol* 155 [3], Seite 1151-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7636184

- Sanmarti, R.; Collado, A.; Gratacos, J.; Herrera, B. E.; Font, J.; Canete, J. D.; Orellana, C. und Munoz-Gomez, J. (1996): Reduced serum creatine kinase activity in inflammatory rheumatic diseases, *J Rheumatol* 23 [2], Seite 310-2. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8882037
- Sasai, M.; Saeki, Y.; Ohshima, S.; Nishioka, K.; Mima, T.; Tanaka, T.; Katada, Y.; Yoshizaki, K.; Suemura, M. und Kishimoto, T. (1999): Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice, *Arthritis Rheum* 42 [8], Seite 1635-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10446862
- Schaller, M.; Burton, D. R. und Ditzel, H. J. (2001): Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease, *Nat Immunol* 2 [8], Seite 746-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11477412
- Schepp, C. P.; Dannecker, L.; Haug, M.; Kummerle-Deschner, J.; Beck, H.; Kotter, I.; Holzer, U. und Dannecker, G. E. (2004): Autoantibodies in juvenile idiopathic arthritis: glucose-6-phosphate isomerase is not a specific target, *J Rheumatol* 31 [8], Seite 1630-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15290745
- Schmitt, A.; Schubert, D.; Sengler, C. und Kamradt, T. (2004): Autoantibodies against glucose-6-phosphate isomerase are not a diagnostic marker for juvenile idiopathic arthritis, *Ann Rheum Dis* 63 [4], Seite 463. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15020348
- Shaw, M. H.; Boyartchuk, V.; Wong, S.; Karaghiosoff, M.; Ragimbeau, J.; Pellegrini, S.; Muller, M.; Dietrich, W. F. und Yap, G. S. (2003): A natural mutation in the Tyk2 pseudokinase domain underlies altered susceptibility of B10.Q/J mice to infection and autoimmunity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [20], Seite 11594-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14500783
- Shimizu, K.; Tani, M.; Watanabe, H.; Nagamachi, Y.; Niinaka, Y.; Shiroishi, T.; Ohwada, S.; Raz, A. und Yokota, J. (1999): The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein, *FEBS Lett* 456 [2], Seite 295-300. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10456327
- Shouda, T.; Yoshida, T.; Hanada, T.; Wakioka, T.; Oishi, M.; Miyoshi, K.; Komiya, S.; Kotsai, K.; Hanakawa, Y.; Hashimoto, K.; Nagata, K. und Yoshimura, A. (2001): Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis, *J Clin Invest* 108 [12], Seite 1781-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11748261

- Smolen, J. S. und Steiner, G. (1998): Are autoantibodies active players or epiphenomena?, *Curr Opin Rheumatol* 10 [3], Seite 201-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9608322
- Smolen, J. S. und Steiner, G. (2003): Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis, *Nat Rev Drug Discov* 2 [6], Seite 473-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12776222
- Solomon, S. (2003): Role of pathogenic auto-antibodies and innate immunity mediators in K/BxN murine model for rheumatoid arthritis, Universität Konstanz.
- Steiner, G.; Hartmuth, K.; Skrinier, K.; Maurer-Fogy, I.; Sinski, A.; Thalmann, E.; Hassfeld, W.; Barta, A. und Smolen, J. S. (1992): Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex, *J Clin Invest* 90 [3], Seite 1061-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1522214
- Steiner, G.; Tohidast-Akrad, M.; Witzmann, G.; Vesely, M.; Studnicka-Benke, A.; Gal, A.; Kunaver, M.; Zenz, P. und Smolen, J. S. (1999): Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis, *Rheumatology (Oxford)* 38 [3], Seite 202-13. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10325658
- Stuart, J. M.; Cremer, M. A.; Townes, A. S. und Kang, A. H. (1982): Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis, *J Exp Med* 155 [1], Seite 1-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7054355
- Svendsen, P.; Andersen, C. B.; Willcox, N.; Coyle, A. J.; Holmdahl, R.; Kamradt, T. und Fugger, L. (2004): Tracking of proinflammatory collagen-specific T cells in early and late collagen-induced arthritis in humanized mice, *J Immunol* 173 [11], Seite 7037-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15557201
- Tada, Y.; Ho, A.; Koh, D. R. und Mak, T. W. (1996): Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis, *J Immunol* 156 [11], Seite 4520-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8666829
- Tak, P. P.; Thirkow, E. W.; Daha, M. R.; Kluin, P. M.; Smeets, T. J.; Meinders, A. E. und Breedveld, F. C. (1995): Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue, *Clin Immunol Immunopathol* 77 [3], Seite 236-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7586733

- Terato, K.; Hasty, K. A.; Reife, R. A.; Cremer, M. A.; Kang, A. H. und Stuart, J. M. (1992): Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen, *J Immunol* 148 [7], Seite 2103-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1545120
- Thorbecke, G. J.; Shah, R.; Leu, C. H.; Kuruvilla, A. P.; Hardison, A. M. und Palladino, M. A. (1992): Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [16], Seite 7375-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1502148
- Trentham, D. E.; Dynesius, R. A. und David, J. R. (1978): Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rats, *J Clin Invest* 62 [2], Seite 359-66. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=27533
- Trentham, D. E.; Townes, A. S. und Kang, A. H. (1977): Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis, *J Exp Med* 146 [3], Seite 857-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=894190
- Tsutsumi, S.; Gupta, S. K.; Hogan, V.; Collard, J. G. und Raz, A. (2002): Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling, *Cancer Res* 62 [15], Seite 4484-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12154059
- van Boekel, M. A.; Vossenaar, E. R.; van den Hoogen, F. H. und van Venrooij, W. J. (2002): Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value, *Arthritis Res* 4 [2], Seite 87-93. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11879544
- Van Damme, J.; Opdenakker, G.; Simpson, R. J.; Rubira, M. R.; Cayphas, S.; Vink, A.; Billaud, A. und Van Snick, J. (1987): Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor, *J Exp Med* 165 [3], Seite 914-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3493322
- van den Berg, W. B.; van de Putte, L. B.; Zwarts, W. A. und Joosten, L. A. (1984): Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice, *J Clin Invest* 74 [5], Seite 1850-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6501574

- van der Lubbe, P. A.; Dijkmans, B. A.; Markusse, H. M.; Nassander, U. und Breedveld, F. C. (1995): A randomized, double-blind, placebo-controlled study of CD4 monoclonal antibody therapy in early rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 38 [8], Seite 1097-106. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7639806
- van Gaalen, F. A.; Toes, R. E.; Ditzel, H. J.; Schaller, M.; Breedveld, F. C.; Verweij, C. L. und Huizinga, T. W. (2004): Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 50 [2], Seite 395-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14872481
- Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors, *Annu Rev Immunol* 10, Seite 411-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1590993
- Verheijden, G. F.; Rijnders, A. W.; Bos, E.; Coenen-de Roo, C. J.; van Staveren, C. J.; Miltenburg, A. M.; Meijerink, J. H.; Elewaut, D.; de Keyser, F.; Veys, E. und Boots, A. M. (1997): Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 40 [6], Seite 1115-25. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9182922
- Verwilghen, J.; Vertessen, S.; Stevens, E. A.; Dequeker, J. und Ceuppens, J. L. (1990): Depressed T-cell reactivity to recall antigens in rheumatoid arthritis, *J Clin Immunol* 10 [2], Seite 90-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1970986
- Wahl, S. M. (1994): Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly, *J Exp Med* 180 [5], Seite 1587-90. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7964446
- Wang, Y.; Kristan, J.; Hao, L.; Lenkoski, C. S.; Shen, Y. und Matis, L. A. (2000): A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis, *J Immunol* 164 [8], Seite 4340-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10754334
- Wang, Y.; Rollins, S. A.; Madri, J. A. und Matis, L. A. (1995): Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [19], Seite 8955-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7568051

- Ward, P. A. und Zvaifler, N. J. (1971): Complement-derived leukotactic factors in inflammatory synovial fluids of humans, *J Clin Invest* 50 [3], Seite 606-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5545123
- Watanabe, H.; Carmi, P.; Hogan, V.; Raz, T.; Silletti, S.; Nabi, I. R. und Raz, A. (1991): Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor, *J Biol Chem* 266 [20], Seite 13442-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1649192
- Watanabe, H.; Takehana, K.; Date, M.; Shinozaki, T. und Raz, A. (1996): Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide, *Cancer Res* 56 [13], Seite 2960-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8674049
- Watson, W. C.; Brown, P. S.; Pitcock, J. A. und Townes, A. S. (1987): Passive transfer studies with type II collagen antibody in B10.D2/old and new line and C57Bl/6 normal and beige (Chediak-Higashi) strains: evidence of important roles for C5 and multiple inflammatory cell types in the development of erosive arthritis, *Arthritis Rheum* 30 [4], Seite 460-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3580014
- Watson, W. C. und Townes, A. S. (1985): Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci, *J Exp Med* 162 [6], Seite 1878-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3934318
- Weyand, C. M.; Hicok, K. C.; Conn, D. L. und Goronzy, J. J. (1992): The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis, *Ann Intern Med* 117 [10], Seite 801-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1416553
- Williams, R. O.; Feldmann, M. und Maini, R. N. (1992): Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [20], Seite 9784-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1409699
- Williams, R. O. und Whyte, A. (1996): Anti-CD4 monoclonal antibodies suppress murine collagen-induced arthritis only at the time of primary immunisation, *Cell Immunol* 170 [2], Seite 291-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8660829

- Wipke, B. T. und Allen, P. M. (2001): Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis, *J Immunol* 167 [3], Seite 1601-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11466382
- Wipke, B. T.; Wang, Z.; Kim, J.; McCarthy, T. J. und Allen, P. M. (2002): Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography, *Nat Immunol* 3 [4], Seite 366-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11896393
- Wolfe, F. und Hawley, D. J. (1998): The longterm outcomes of rheumatoid arthritis: Work disability: a prospective 18 year study of 823 patients, *J Rheumatol* 25 [11], Seite 2108-17. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9818651
- Wooley, P. H.; Dutcher, J.; Widmer, M. B. und Gillis, S. (1993): Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice, *J Immunol* 151 [11], Seite 6602-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8245488
- Wooley, P. H.; Luthra, H. S.; Stuart, J. M. und David, C. S. (1981): Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates, *J Exp Med* 154 [3], Seite 688-700. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6792316
- Wooley, P. H.; Seibold, J. R.; Whalen, J. D. und Chapdelaine, J. M. (1989): Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease, *Arthritis Rheum* 32 [8], Seite 1022-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2765002
- Xu, W.; Seiter, K.; Feldman, E.; Ahmed, T. und Chiao, J. W. (1996): The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuro-leukin or phosphoglucose isomerase, *Blood* 87 [11], Seite 4502-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8639816
- Yuasa, T.; Kubo, S.; Yoshino, T.; Ujike, A.; Matsumura, K.; Ono, M.; Ravetch, J. V. und Takai, T. (1999): Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis, *J Exp Med* 189 [1], Seite 187-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9874575

Ziolkowska, M.; Koc, A.; Luszczkiewicz, G.; Ksiezopolska-Pietrzak, K.; Klimczak, E.; Chwalinska-Sadowska, H. und Maslinski, W. (2000): High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism, J Immunol 164 [5], Seite 2832-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10679127

Danksagung

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Thomas Kamradt, der mich bei dieser Arbeit hervorragend betreut hat, immer offen für Diskussionen war und unzählige Anregungen und Hilfestellungen gegeben hat.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Harald Saumweber, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit an der Humboldt Universität zu betreuen.

Kerstin Bonhagen möchte ich danken für Ihre unzähligen Hilfestellungen bei allen Fragen der Zellbiologie und für das Korrekturlesen und die vielen konstruktiven Ideen.

Danken möchte ich auch Bert Maier, der mich bei dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat und immer offen für Diskussionen war.

Bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern aus der AG-Kamradt möchte ich mich für eine wunderschöne Zeit bedanken, die ich immer in guter Erinnerung behalten werde.

Zu Dank bin ich auch Gabriele Fernahl und Janine Karle verpflichtet, die unzählige Gewebeschnitte für mich angefertigt haben und Dr. Lars Morawietz und Prof. Dr. Veit Krenn, die stets ein offenes Ohr für alle histologischen Fragen hatten.

Bei den Labmanagern möchte ich mich für eine tolle Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass sie immer offen für Fragen waren. Genauso möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Tierversuchszucht in Marienfelde, insbesondere Manuela Ohde und Helmut Schäfer, bedanken.

Prof. Jochen Sieper und Dr. Udo Schneider möchte ich für die Bereitstellung der Seren danken.

Lisa Bruns und Sylvia Heink möchte ich für das Korrekturlesen danken.

Mein besonders großer Dank gilt meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung.

In gleicher Weise möchte ich auch Anja besonders danken, die mich stets aufgemuntert und aufgebaut und sehr unterstützt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne erlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Es wurden keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel benutzt.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze auch keinen entsprechenden Doktorgrad.

Mir ist die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung bekannt.

Berlin, den

David Schubert

Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

Schubert D., Schmidt M., Zaiss D., Jungblut P.R., Kamradt T.

Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA.

Nat Immunol. 2002 May;3(5):411

Schmitt A., Schubert D., Sengler C., Kamradt T.

Autoantibodies against Glucose-6-phosphate isomerase are not a diagnostic marker for juvenile idiopathic arthritis.

Ann Rheum Dis. 2004 Apr; 63(4):463

Schubert D., Maier B., Morawietz L., Krenn V., Kamradt T.

Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T-cell dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice.

J Immunol. 2004 Apr 1; 172(7): 4503 – 9

Kamradt T. und Schubert D.

The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis

Arthritis Res Ther 2005, 7(1):20-28

Präsentationen:

18. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie/Halle 13.-16. März 2002

Vortrag: Autoantibodies against GPI and Creatine Kinase in Rheumatoid Arthritis

1. Berliner Studententag der Biowissenschaften/Berlin 19. Juli 2002

Vortrag: Autoantikörper gegen GPI und Kreatinkinase in Rheumatoider Arthritis

31. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie/Berlin 18.-21. September 2002

Poster: Autoantibodies against GPI and Creatine Kinase in Rheumatoid Arthritis

1. Bioscience Workshop der Schering AG/Berlin 10.-12. September 2003

Poster: Immunization with the Glycolytic Enzyme Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI)

Induces Peripheral Polyarthritis in Normal Mice

34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie/Berlin 24.-27. September 2003

Poster: Immunization with the Glycolytic Enzyme Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI)

Induces Peripheral Polyarthritis in Normal Mice

24. European Workshop for Rheumatology Research (EWRR)/Berlin 26.-29. Februar 2004

Poster und Vortrag: Immunization With GPI Induces T-cell Dependent Peripheral

Polyarthritis in Genetically Unaltered Mice

Annual European Congress of Rheumatology (EULAR)/ Berlin 9.-12. Juni 2004

Vortrag: Immunisation With GPI Induces T-cell Dependent Peripheral Polyarthritis in

Genetically Unaltered Mice

12. International Conference for Immunology (ICI)/Montréal (Kanada) 18.-23. Juli 2004

Poster und Vortrag: Immunization with Glucose-6-Phosphate Isomerase (GPI) Induces

Peripheral Polyarthritis in Normal Mice

Berlin, den

David

Schubert